

Landwirtschaftskammer NRW  
Aus der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Krefeld  
Fachbereich Mikrobiologie  
und  
dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie am Max Rubner-Institut, Kiel

**Nachweis und Identifizierung von Hefen und Staphylokokken in  
Salzlake von Fetakäsen  
bei unterschiedlichen Lagertemperaturen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Dipl. Ing. Ulrike Haki  
aus Weimar

Krefeld / Kiel, 2009

---

Dekan:	Prof. Dr. U. Latacz-Lohmann
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. K. J. Heller
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Schwarz
Tag der mündlichen Prüfung:	5. November 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und  
Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1</b>	<b>4</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>7</b>
<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>7</b>
<b>Fetakäse – Historie, Bedeutung, Definition</b>	<b>7</b>
<b>1.2</b>	<b>10</b>
<b>Technologische Aspekte der Fetakäseherstellung.....</b>	<b>10</b>
1.2.1	10
Traditionelle Herstellung.....	10
1.2.2	11
Industrielle Herstellung.....	11
<b>1.3</b>	<b>16</b>
<b>Mikrobiologische Einflussfaktoren der Fetakäseherstellung</b>	<b>16</b>
1.3.1	16
Mikrobiologische Spezifikationen für Fetakäse.....	16
1.3.2	17
Die mikrobiologische Qualität von Fetakäse in Abhängigkeit von der Rohware, Zusatz- und Hilfsstoffen.....	17
1.3.3	19
Nachgewiesene Hauptflora von Fetakäseoberflächen und deren Salzlake.....	19
1.3.4	19
Sekundärflora und pathogene Keime.....	19
<b>2</b>	<b>21</b>
<b>Hefen.....</b>	<b>21</b>
2.1	21
Entwicklung von Hefen während der Herstellung, Reifung und Lagerung von Fetakäsen und deren Auswirkungen.....	21
<b>3</b>	<b>23</b>
<b>Staphylokokken.....</b>	<b>23</b>
3.1	23
Bedeutung von <i>Staphylococcus aureus</i> in Lebensmitteln.....	23
3.2	24
Nachweis von <i>Staphylococcus aureus</i> in Salzlake und den entsprechenden Käseoberflächen	24
<b>4</b>	<b>26</b>
<b>Aufgabenstellung.....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>27</b>
<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
<b>5.1</b>	<b>27</b>
<b>Chemikalien.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2</b>	<b>27</b>
<b>Geräte.....</b>	<b>27</b>
<b>5.3</b>	<b>27</b>
<b>Nährmedien.....</b>	<b>27</b>
<b>5.4</b>	<b>28</b>
<b>Verwendete Fetakäse aus dem Handel.....</b>	<b>28</b>
5.4.1	29
pH-Wert-Bestimmung.....	29
5.4.2	29
Bestimmung des Salzgehaltes.....	29
5.4.3	30
Sensorische Bewertung.....	30
<b>5.5</b>	<b>30</b>
<b>Charakterisierung der Hefen und Staphylokokken im Lagerungstest.....</b>	<b>30</b>
5.5.1	30
Bestimmung der Keimzahlen (Kolonie bildende Einheiten).....	30
5.5.2	31
Isolierung und Differenzierung .....	31
5.5.3	31
API-Identifizierungssystem.....	31
5.5.3.1	31
System zur Identifizierung von Hefen ID 32 C.....	31

5.5.3.2	System zur Identifizierung von Staphylokokken ID 32 STAPH.....	31
5.5.4	Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis (ARDRA) Hefen...	32
5.5.4.1	Probenvorbereitung und Zellaufschluss für Hefen.....	32
5.5.4.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	32
5.5.4.3	Restriktionsanalyse.....	34
5.5.4.4	Gelelektrophorese.....	34
5.5.5	Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis (ARDRA) Staphylokokken.....	34
5.5.5.1	Probenvorbereitung und Zellaufschluss für Staphylokokken.....	34
5.5.5.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	35
5.5.5.3	Restriktionsanalyse.....	35
5.5.5.4	Gelelektrophorese.....	36
<b>5.6</b>	<b>Stammhaltung und Kultivierung im Kontaminationstest mit <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>36</b>
5.6.1	Herkunft.....	36
5.6.2	Kontaminationsversuche.....	36
5.6.2.1	Technologie zur Herstellung der Fetakäse.....	36
5.6.2.2	Kontamination der Fetakäse.....	36
<b>6</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>6.1</b>	<b>Identifizierung der gefundenen Hefen.....</b>	<b>38</b>
6.1.1	Mikroskopische Darstellung und spezifische Eigenschaften.....	38
6.1.2	Biochemische Methoden ID 32 C.....	46
6.1.3	Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis (ARDRA) und Gelelektrophorese.....	46
<b>6.2</b>	<b>Identifizierung der gefundenen Staphylokokken.....</b>	<b>48</b>
6.2.1	Biochemische Methoden ID 32 STAPH.....	48
6.2.2	Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis (ARDRA) und Gelelektrophorese.....	49
<b>6.3</b>	<b>Ergebnisse im Lagertest bei unterschiedlichen Lager- temperaturen.....</b>	<b>50</b>
6.3.1	Versuchsreihe D1 (Bulgarischer Fetakäse).....	50
6.3.1.1	Charakterisierung über pH-Wert, Salzgehalt, Hefen- und Staphylokokkenentwicklung.....	50
6.3.1.2	Sensorische Bewertung .....	52
6.3.2	Versuchsreihe D2 (Griechischer Fetakäse).....	55
6.3.2.1	Charakterisierung über pH-Wert, Salzgehalt, Hefen- und Staphylokokkenentwicklung.....	55
6.3.2.2	Sensorische Bewertung .....	57
6.3.3	Versuchsreihe D3 (Französischer Fetakäse).....	60
6.3.3.1	Charakterisierung über pH-Wert, Salzgehalt, Hefen- und Staphylokokkenentwicklung.....	60
6.3.3.2	Sensorische Bewertung .....	62
6.3.4	Versuchsreihe D4 (Holländischer Fetakäse).....	65
6.3.4.1	Charakterisierung über pH-Wert, Salzgehalt, Hefen- und Staphylokokkenentwicklung.....	65
6.3.4.2	Sensorische Bewertung.....	67

<b>6.4</b>	<b>Kontaminationsversuche während der Reifung in Abhängigkeit von der Reifungstemperatur, dem pH-Wert und dem Salzgehalt der Lake.....</b>	<b>70</b>
6.4.1	Wachstumsverhalten von <i>Staphylococcus aureus</i> in Salzlake und auf der Käseoberfläche.....	70
6.4.1.1	Keimzahlentwicklung in Salzlake mit 8% NaCl und Reifungstemperaturen von 10°C und 15°C.....	70
6.4.1.2	pH-Wertverlauf.....	72
6.4.1.3	Salzgehaltsverlauf.....	72
6.4.2	Wachstumsverhalten von <i>Staphylococcus aureus</i> bei 15°C Reifungstemperatur und Salzlake mit 10% NaCl.....	75
6.4.2.1	Keimzahlentwicklung während des Reifungsverlaufes.....	75
6.4.2.2	pH-Wertverlauf.....	75
6.4.2.3	Salzgehaltsverlauf.....	75
<b>7</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
<b>7.1</b>	<b>Sichere Identifizierung der Hefen und Staphylokokken mittels geeigneter Methoden.....</b>	<b>79</b>
<b>7.2</b>	<b>Untersuchungsergebnisse kommerzieller Fetakäse unter dem Gesichtspunkt der Verkehrsfähigkeit.....</b>	<b>81</b>
7.2.1	Entwicklung der Hefen- und Staphylokokkenpopulation in Fetakäsen bei unterschiedlichen Lagertemperaturen über das MHD hinaus.....	81
<b>7.3</b>	<b>Kontaminationsversuche während der Reifezeit.....</b>	<b>85</b>
7.3.1	Einflussfaktor Salzgehalt der Lake.....	85
7.3.2	Einflussfaktor pH-Wert der Salzlake.....	85
7.3.3	Einfluss der Salzlake bei unterschiedlichen Temperaturen auf den Kontaminationskeim <i>Staphylococcus aureus</i> während der Reifezeit.....	86
<b>7.4</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>

**Abkürzungen**

$\alpha$ -La	$\alpha$ -Lactalbumin
$\beta$ -Lg	$\beta$ -Lactoglobulin
Abb.	Abbildung
ADH	L-Arginin
Ala	Alanin
<i>aqua bidest</i>	bidestilliertes Wasser
<i>aqua demin.</i>	entmineralisiertes Wasser
<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA-Restrictions Analysis
Arg	Arginin
$a_w$ -Wert	Wasseraktivität („activity of water“)
BAfM	Bundesanstalt für Milchforschung
bp	Basenpaare
c	maximale Anzahl Proben, die zwischen m und M liegen können (Klassenplan)
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
d	Tag
DIN	Deutsche Industrie Norm
DLG	Deutsche Landwirtschafts Gesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FB	Na-Laurylsulfat, Dimethylformomit, Dimethylsulfoxid, Fast Blue BB
F(ett) i.T	Fett in der Trockenmasse

---

g	Gramm
GDL	Gluconodelta-Lacton
Glu	Glucose
Gly	Glycin
h	Stunde
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
Id	Identifizierungswahrscheinlichkeit
IFS	International Food Standard
ITS	Internal Transcribed Spacers
KbE	Kolonie bildende Einheit
kb	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
M	oberer Grenzwert im Klassenplan („Höchstwert“)
m	unterer Grenzwert im Klassenplan
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
MPa	Megapascal
μ	mikro
n	Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe im Klassenplan
n.n	nicht nachweisbar
NIT1	Sulfanilsäure+Essigsäure,
NIT2	N,N-Dimethyl-1-naphtylamin + Essigsäure
ODC	L-Ornithin
p.A.	pro Analysis

---

PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rotations per minute
°SH	Soxhlet-Henkel-Grad-Bestimmung
s	Sekunden
t	Tonne
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TM	Trockenmasse
U	Unit(s)
UF	Ultrafiltration
URE	Harnstoff
v. Chr.	vor Christus
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
VO	Verordnung
VPA	Kaliumhydroxid
VPB	$\alpha$ -Naphtol
Wff	Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse
w/v	Gewicht pro Volumen



## 1 Einleitung

### 1.1 Fetakäse – Historie, Bedeutung, Definition

Die exakte Herkunft des Fetakäses, bzw. dessen Herstellprozesses ist zeitlich schwierig einzuordnen. Der Käse hat seinen Ursprung im mittleren Osten. Fermentierte Milchprodukte und Käse wurden in unterschiedlichen Zivilisationen, wie zum Beispiel der Assyrer, Babylonier, Griechen und Römer, intensiv entwickelt (Robinson und Tamime, 1991).

Die Käseproduktion soll ca. 7000 vor Christi, während der Domestikation verschiedener Tiere wie Kühe, Ziegen, Schafe und Büffel durch den Menschen ihren Ursprung haben.

Zu dieser Zeit war die Milchproduktion recht begrenzt, da nicht sesshafte Nomaden keine intensive Tierhaltung betrieben. Die Aufbewahrung von frisch gemolkener Milch erfolgte in Behältern aus Tierhaut oder getrockneten Tiermägen, die während der Wanderung in der Nähe der Kamele aufbewahrt wurden. Durch die Körperwärme, und durch das warme Klima, (über 30°C) fermentierte die Milch zu einem quarkähnlichen Produkt (Robinson und Tamime, 1991).

Die erwähnten Temperaturen bildeten optimale Bedingungen für die Stoffwechselaktivitäten der natürlich in der Milch vorkommenden Mikroorganismen und machte die damit verbundene Säuerung und Gerinnung der Milch durch Enzyme möglich. Das Trennen von Käsebruch und Molke wurde vermutlich durch die Bewegung der Tiere verursacht. Anschließend wurde die Molke abgetrennt und der Käsebruch durch Pressen mit der Hand und Trocknen in der Sonne konzentriert.

Später wurde entdeckt, dass das Einlagern des Käsebruches in Salzlake zu längerer Haltbarkeit und zu geschmacklicher Verbesserung führte.

Man kann davon ausgehen, dass sich die moderne Käseproduktion aus  
**a)** der Herstellung saurer Milchprodukte (**Laban, Ayran oder Yoghurt**) und  
**b)** durch Herstellung eines konzentrierten Yoghurts (**Labneh**) entwickelte, wobei im Sackverfahren die Molke abgetrennt und das Konzentrat gesalzen wurde. Dieses spätere Produkt ist bekannt als **Yoghurt-Käse** und ähnelt in der Produktionsweise der Herstellung von Weichkäse in Salzlake. Das Verfahren ist in alter Literatur beschrieben; so schrieb Homer (1184 v. Chr.) über die Käseherstellung aus Schaf- oder Ziegenmilch als **Vorläufer des Fetakäses** und **Haloumikäses**, die weitläufig in Griechenland, Zypern und Bulgarien produziert wurden (Robinson und Tamime, 1991).

Im Vergleich zur Weltkäseproduktion repräsentieren Salzlakekäse eine relativ kleine Gruppe, die jedoch eine erhebliche Bedeutung im mittleren Osten und in den Balkanländern hat.

In Griechenland macht Käse einen Hauptteil der Ernährung aus. Mit einem pro Kopfverbrauch von 22 kg/Jahr ist das ein Spitzenplatz in der Welt. Der Fetakäse-Verbrauch in Griechenland liegt bei etwa 14 kg/Person und Jahr.

Unter den griechischen Käsen besitzt **Feta** als traditioneller Käse aus Schaf- und Ziegenmilch eine einzigartige Bedeutung, durch seinen unvergleichlich leicht salzig, säuerlichen Geschmack und seine weiche, aber trotzdem kompakt schnittfeste Konsistenz.

Feta wird auch **Teleme**s oder **Sfina** genannt, wobei zwischen beiden Bezeichnungen praktisch kein Unterschied besteht (Georgakis, 1982).

In Nord-West-Europa wird Feta hauptsächlich aus Kuhmilch hergestellt, was einen Vergleich mit traditionell hergestelltem Fetakäse erschwert. Als Qualitätsmaßstab werden allerdings die charakteristischen Eigenschaften des traditionell hergestellten Fetakäses herangezogen (Kasapis und Boskou, 2001).

Außerhalb Griechenlands ist der Verzehr von Fetakäse in Deutschland mit 35.000t/Jahr am höchsten, bedingt durch den hohen Anteil türkischer und griechischer Bevölkerungsgruppen. Im Vergleich dazu hatten jedoch 75% der deutschen Bevölkerung bis 1994 noch keinen Feta konsumiert (Mann, 1999).

Durch den liberalisierten Handel mit oben genannten Ländern ist die Popularität dieser Käse in Europa gestiegen. Die Herstellung industriell hergestellter Salzlakekäse hat sich, außerhalb der Ursprungsregion, nach Nord-West-Europa verlagert durch:

- Ethnographische Verschiebungen,
- günstigere klimatische Bedingungen,
- Veränderung der Herstellungsmethoden wie zum Beispiel:
  - Herstellung eines trockeneren Käsebruchs,
  - Schutz des Käses durch partielles Salzen,
  - Kühlere Lagerung der Käse (Robinson und Tamime, 1991).

Es gilt folgende Begriffsbestimmung nach Codex Alimentarius, im CODEX-Gruppenstandard für Käse in Lake (CODEX STAN 208-1999):

*„Käse in Lake ist halbharter bis weicher gereifter Käse gemäß den Begriffsbestimmungen in Standard A-6. Der Teig hat eine weiße bis gelbliche Farbe und eine kompakte Textur, die sich zum Schneiden eignet und keine bzw. nur wenige mechanische Öffnungen aufweist. Der Käse hat keine Rinde im eigentlichen Sinne und wird in Lake gereift und konserviert, bis er an den Verbraucher geliefert bzw. für diesen verpackt wird.“*

Mair-Waldburg (1974) macht folgende Angaben:

***Feta, Weichkäse, Typ Lake-Käse, Griechenland,***

*Feta ist der in Griechenland am meisten hergestellte Käse.*

*Form, Größe, Gewicht: Würfel oder Quader verschiedener Größe.*

***Eigenschaften:***

***Äußeres:*** ohne Rinde, weiß

***Inneres:*** Farbe weiß

***Teigbeschaffenheit:*** weich, aber noch schnittfest

***Lochung:*** keine

***Geruch und Geschmack:*** ein wenig säuerlich, pikant und etwas salzscharf, aber nicht bitter.

***Milchart:*** Ursprünglich wurde Feta aus reiner Schafmilch oder Schafmilch mit einem Zusatz von Ziegenmilch hergestellt.

*Heute wird auch Kuhmilch (allein oder mit Schafmilch und/oder Ziegenmilch vermischt) verwendet.*

**Zusammensetzung:**

	<i>analytisch ermittelte Durchschnittswerte</i>
<i>Fett i. T</i>	45-59%
<i>TM</i>	40-55%
<i>Wff</i>	65-79%
<i>NaCl</i>	2,4-4,4%
<i>NaCl im Käsewasser</i>	3,9-7,6%
<i>pH-Wert des reifen Käses</i>	4,80-4,20

Die Bezeichnung „Feta“ wurde von Griechenland im Januar 1994 als „geschützte Ursprungsbezeichnung“ angemeldet und gemäß der VO(EWG) Nr. 2081/92 zum Schutz von geographischen Angaben und Ursprungsbezeichnungen eingetragen (Rieke, 2005).

Durch die VO (EG) Nr. 1829/2002 ist der Name „Feta“ für Griechenland in die VO (EG) Nr. 1107/96 eingetragen worden und somit griechischen Erzeugnissen vorbehalten. Für Hersteller in anderen EU-Ländern galt eine Übergangsfrist von 5 Jahren bis Oktober 2007 (Güth, 2006).

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung war Feta die gängige Bezeichnung für Lake-Käse mit den vorangestellten Eigenschaften; aus diesem Grund wurde die deklarierte Verkehrsbezeichnung durchgängig verwendet.

## 1.2 Technologische Aspekte der Fetakäseherstellung

### 1.2.1 Traditionelle Herstellung

Fetakäse wird traditionell aus Schafmilch hergestellt. Sie bürgt für die beste Qualität des Feta. Eine Mischung aus Schaf- und Ziegenmilch, ergibt auch noch eine gute Qualität, wenn der Anteil an Ziegenmilch nicht mehr als 20-30% beträgt. Aus reiner Ziegenmilch erhält man einen härteren Käse mit einem strengeren Geschmack im Vergleich zu reinem Schafkäse.

Die wesentlichen technologischen Schritte sind der Abb. 1 zu entnehmen:

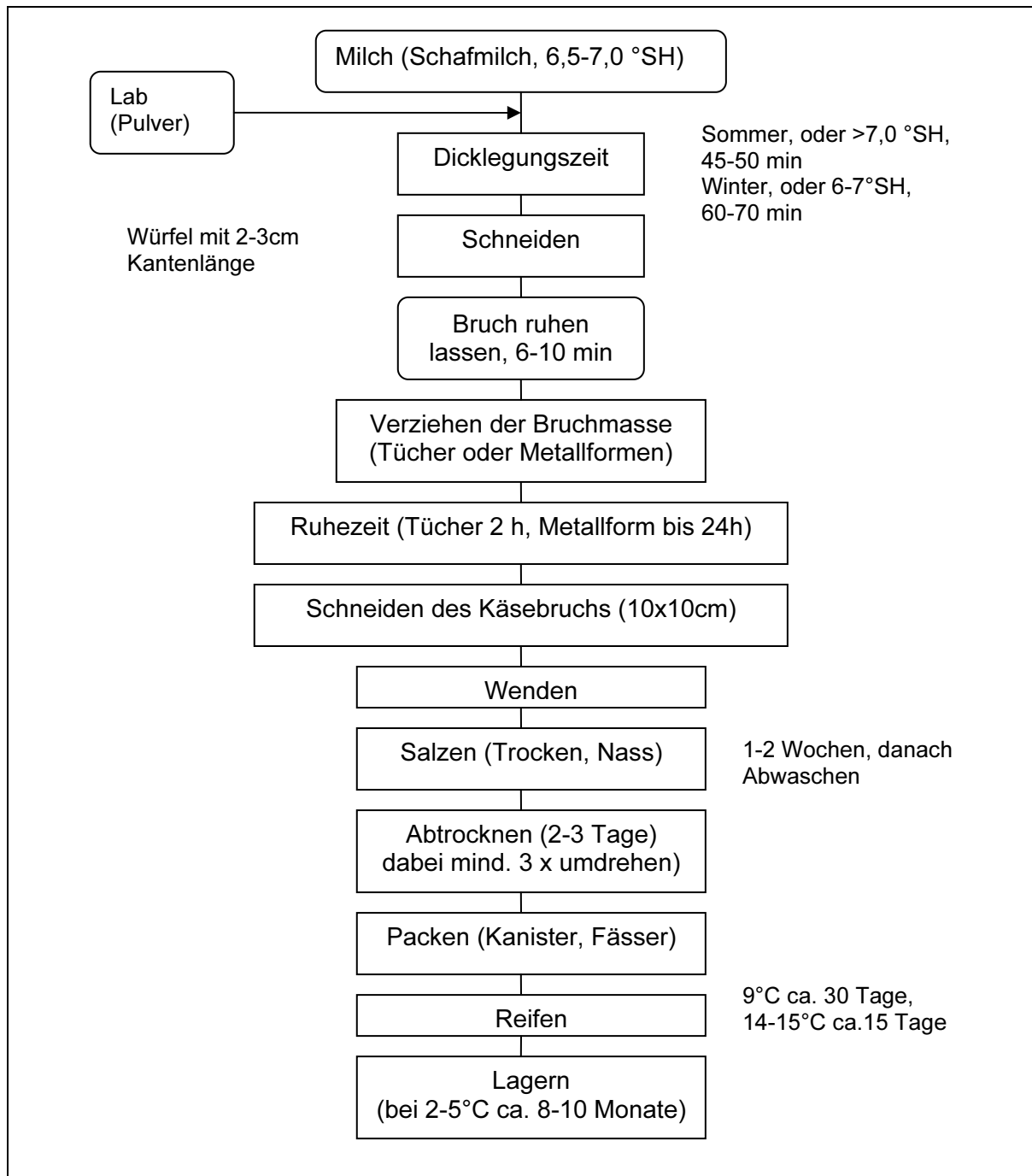


Abb.1: Traditionelle Herstellung von Fetakäse nach Georgakis (1982), Robinson und Tamime (1991)

Die verwendete Milch sollte frisch und von guter Qualität sein.

Als Lab verwendet man die luftgetrockneten Labmägen von Lämmern (Robinson und Tamime, 1991) und als Säurewecker (Joghurtkultur) dienen Wildstämme aus Milchsäurebakterien, möglicherweise waren auch Hefen beteiligt.

Einer der wichtigsten Parameter der Feta-Herstellungstechnologie ist die genaue Zeit bei der die koagulierte Milch geschnitten werden sollte. Das Koagulum muss sich mit dem Finger zerteilen lassen, ohne an ihm zu haften. Dann kann mit Hilfe einer Käseharfe geschnitten werden (in Würfel von 2-3 cm Kantenlänge).

Die Ruhezeit hängt hauptsächlich von der Umgebungstemperatur und von der Intensität des Pressens des Bruches ab. Je länger die Ruhezeit und je höher der Druck, desto mehr Molke tritt aus, so dass der Käse am Ende eine höhere Trockenmasse aufweist (Georgakis, 1982).

Zum „Trockensalzen“ der Käse wird granuliertes Salz von Reiskorngröße oder größer verwendet. Dieses Salz löst sich langsamer auf und unterstützt so die normale Drainage des Käses.

Feineres Salz löst sich zu schnell auf, dadurch wird die Käseoberfläche hart, übersalzt und das Abtropfen wird verhindert (Hayaloglu et al., 2002).

Nach dem Salzen verbleiben die Käsestücke (1-2 Wochen) auf dem Käsetisch und werden alle 24h gewendet, wobei sich eine schleimige Oberfläche mit den typischen Bakterien und Hefen bildet. Diese Mikroflora ist wichtig für den Reifungsverlauf und die Entwicklung organoleptischer Eigenschaften des Feta.

Wenn die Platzkapazität für das Reifen auf Käsetischen nicht ausreicht, wird oft in Fässern gearbeitet, in denen die Käsestücke schichtweise (3-4 Schichten) plaziert und gesalzen werden. Alle zwei Tage werden die Positionen der Käsestücke zum Abtrocknen und Salzen von Fass zu Fass gewechselt.

Nach 1-2 Wochen werden die Käsestücke vorsichtig mit Wasser oder Salzlake und einer weichen Bürste gewaschen, um Unreinheiten der Käseoberfläche, die meist vom Salz herrühren, zu entfernen.

Danach werden die Käsestücke vorsichtig, mit Pergamentpapier zwischen den Schichten, eng in Fässer gelagert. Anschließend wird Salzlake mit 6-8% NaCl zugegeben, die Fässer verschlossen und in Reifungsräumen mit 14-16°C und relativ hoher Luftfeuchte zur Endreifung gebracht. Von Zeit zu Zeit werden die Fässer mit Hilfe eines Spundzapfens geöffnet, dabei kann gebildetes Gas entweichen jedoch darf die Umgebungsluft nicht in die Fässer gelangen. Das ist wichtig um mit eventuell vorhandenen Schimmelpilzsporen der Luft nicht die Käseoberfläche zu kontaminieren. Nach ca. einer Woche wird verdunstete Salzlake nachgefüllt.

Wenn ein pH-Wert von 4,4-4,6 im Käse erreicht ist, kommen die Fässer für die letzten 2 Monate, vom Produktionstag an, in Lagerräume mit einer Temperatur von 3-4°C (Robinson und Tamime, 1991).

### **1.2.2 Industrielle Herstellung**

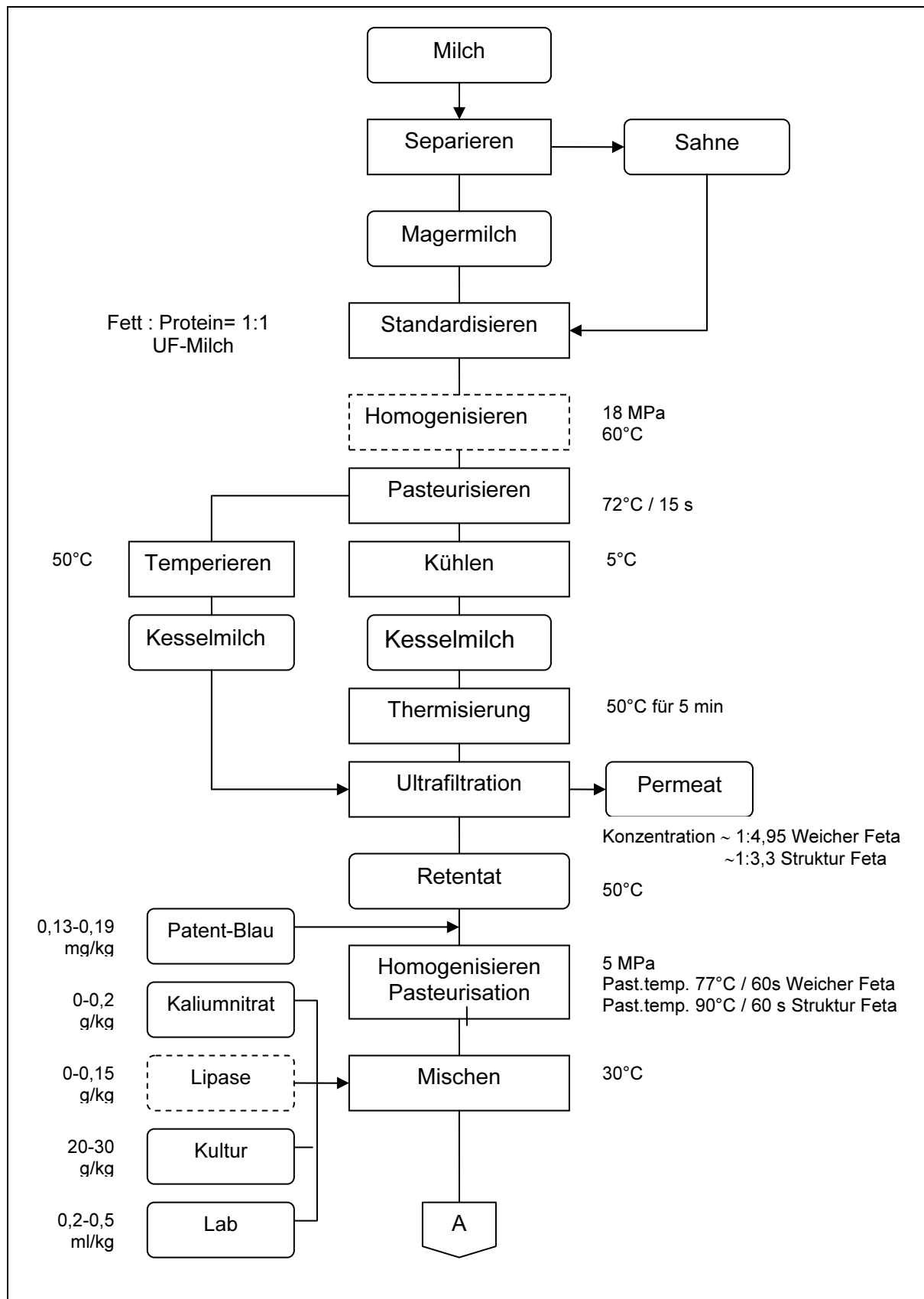
Die moderne Technologie der Fetakäseherstellung bemüht sich um Mechanisierung und Automatisierung der Produktion. Die Entwicklungen konzentrieren sich auf:

- 
- Veränderung der Ausgangsmilch durch Konzentration der Milch mittels Ultrafiltration (UF),
  - Technologische Entwicklungen bezüglich Mechanisierung und Automatisierung des Käseprozesses,
  - Entwicklung der Starterkulturen (Säurewecker),
  - progressives Marketing national und international, um auch ein steigendes Bewusstsein der Verbraucher bezüglich ernährungsphysiologischer Aspekte des Feta zu fördern.

Die industrielle Herstellung wird unter folgenden speziellen Aspekten betrachtet:

- Milchbehandlung, einschließlich Homogenisierung, Hitzebehandlung und Ultrafiltration,
- verstärkte Verwendung von Kuhmilch,
- die Benutzung definierter Starterkulturen,
- die Zugabe diverser Hilfsstoffe zum Retentat wie zum Beispiel Patent Blau (Brilliant Blau) zur Reduzierung der gelblichen Farbe von Kuhmilch durch Absorption und die Zugabe von Kaliumnitrat zur Unterdrückung sporenbildender Bakterien,
- Bildung des Koagulums und die Behandlung des Bruches nach dem Schneiden und Molkeentzug (einschließlich der späteren Behandlungen, die die Struktur des Feta beeinflussen).

Die wichtigsten Abschnitte der industriellen Herstellungstechnologie sind der Abbildung 2 zu entnehmen.



kontinuierlich fortlaufen

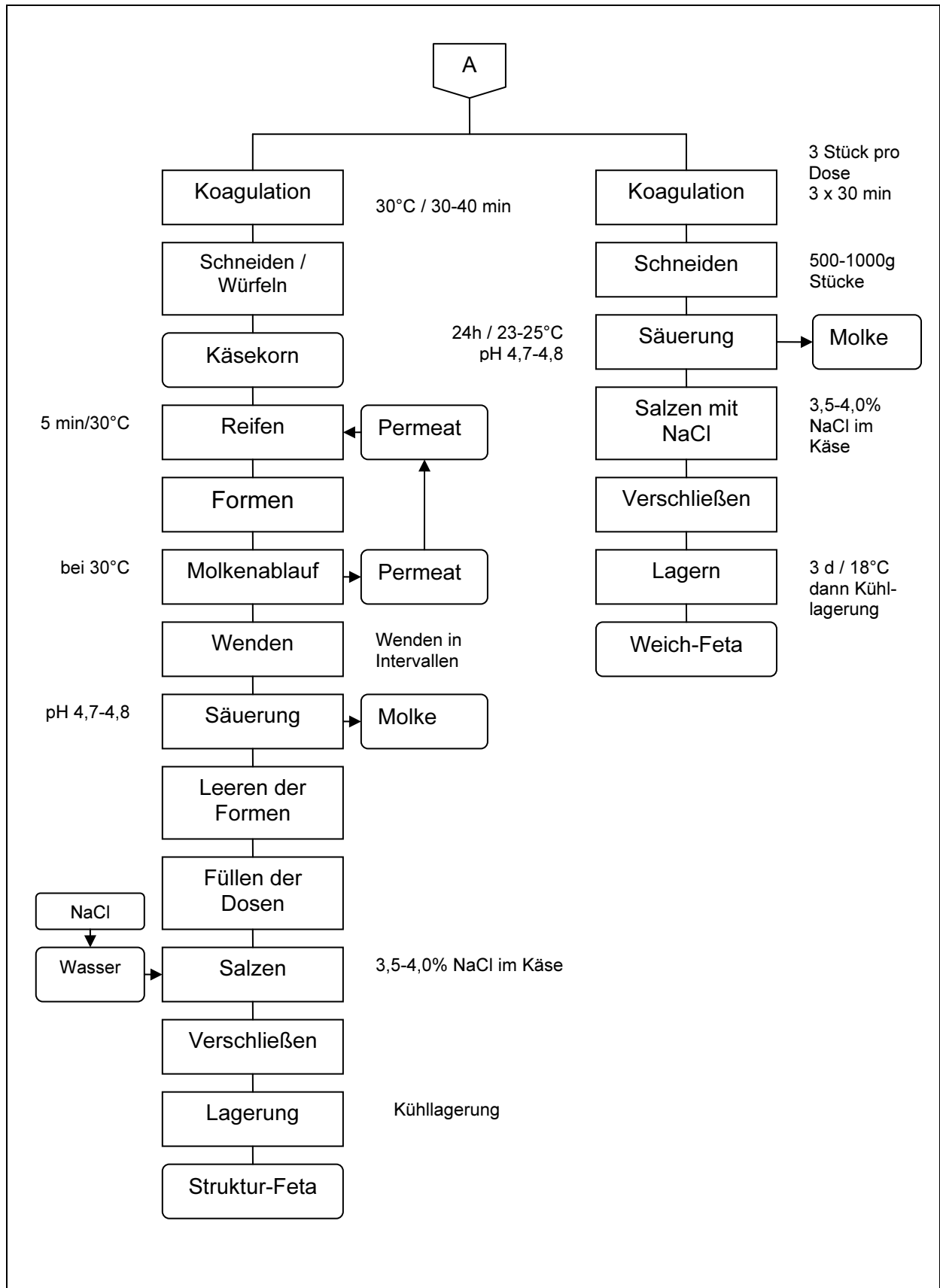


Abb. 2: Vereinfachtes Fließschema für die industrielle Herstellung von ultrafiltriertem Struktur-Feta und Weich-Fetakäse nach Robinson und Tamime (1991)



Homogenisierung, Hitzebehandlung und Ultrafiltration bewirken:

- eine stabile „Fett in Wasser“ Emulsion der Käsereimilch,
- das Einleiten spezifischer chemisch physikalischer Verhältnisse in der Milch,
- die Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen in der Milch,
- die Konzentration von Fett und Eiweiß in der Milch für den Käsungsprozess.

Der Durchbruch der Weichkäseherstellung mit ultrafiltrierter Milch gelang durch die Arbeit von Mabouis et al. (1969, 1980), die als MMV-Methode, benannt nach den Erfindern Maubois & Moquot, 1975, bekannt wurde.

Die chemische Zusammensetzung des ultrafiltrierten Retentats ist ähnlich der Zusammensetzung des Käses. Da in den Molke-Protein-Fractionen  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -La) und  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) im UF-Retentat zurückgehalten werden, ist die Käseausbeute deutlich erhöht.

Daher ist ein Anstieg des Einsatzes von UF-Membranen in der Milchindustrie weltweit zu verzeichnen. 1987 betrug die UF-Käse Produktion bei Feta 56%, Mozzarella 10% und anderen Weichkäsesorten 11% (Robinson und Tamime, 1991).

### 1.3 Mikrobiologische Einflussfaktoren der Fetakäseherstellung

#### 1.3.1 Mikrobiologische Spezifikationen für Fetakäse

Die Zusammensetzung und mikrobiologische Qualität von Fetakäse hängt von mehreren Faktoren ab:

- Saisonal bedingte Milchqualität,
- Standardisierung der Milch,
- Milchart (Kuh-, Schaf-, Ziegenmilch),
- Technologische Bedingungen (traditionell oder UF),
- Veränderungen während der Reifungszeit mit den entsprechenden komplexen Interaktionen. Bezüglich der UF-Fetakäseherstellung sind in der Literatur dazu wenige Daten zu finden (Robinson und Tamime, 1991).

Die mikrobiologische Qualität von Fetakäse und anderer Lebensmittel wird unter zwei Hauptaspekten betrachtet:

- Schutz des Verbrauchers vor pathogenen Keimen,
- Vorbeugen des mikrobiellen Verderbes während der Lagerung und verbesserte Haltbarkeit.

In verschiedenen Ländern existieren entsprechende mikrobiologische Spezifikationen für Fetakäse. Als Beispiel wird hier die Spezifikation des Iran dargestellt, da dieses Land Hauptimporteur von Fetakäse im mittleren Osten ist.

Tab. 1: Iranischer Standard: Mikrobiologische Spezifikation für Fetakäse (1983)  
(nach Robinson und Tamime, 1991)

Mikroorganismus	Anzahl
<i>Coliforme Keime</i>	nicht nachweisbar in 0,01g
<i>Escherichia coli</i>	nicht nachweisbar in 1,0g
<i>Staphylococcus aureus</i>	nicht nachweisbar in 1,0g
<i>Brucella spp.</i>	nicht nachweisbar in 25,0g
<i>Salmonella spp.</i>	nicht nachweisbar in 25,0g
Hefen und Schimmelpilze	<100 KbE g <sup>-1</sup>

Man könnte argumentieren, dass solche Standards ohne Schwierigkeiten zu erreichen sind, denn:

- das UF Retentat wird einer hohen Hitzebehandlung unterzogen (90°C, 60s),
- der Säuregehalt (pH<4,4) ist hoch,
- der Salzgehalt überschreitet 3% und
- die hygienischen Bedingungen und die Umgebungsatmosphäre sorgen für ein geringes Rekontaminationsrisiko (Maupoulos et al., 1999).

Jedoch trotz dieser Bedingungen und der beschriebenen Maßnahmen während des Produktionsprozesses, wurden Mikroorganismen im Fetakäse gefunden, die ein öffentliches Gesundheitsrisiko und/oder Verderb des Produktes verursachen können. Darauf wird im Folgenden eingegangen.

### 1.3.2 Die mikrobiologische Qualität von Fetakäse in Abhängigkeit von der Rohware, Zusatz- und Hilfsstoffen

Die Qualität der Rohmaterialien ist von entscheidender Bedeutung für die Qualität des Endproduktes.

Abdel-Fatah et al. (1998) untersuchten Roh- Hilfs- und Zusatzstoffe ultrafiltrierter Fetakäseproben von Herstellern, mit Reklamationen aus dem Handel wegen geblähter Fetakäseproben. Die Untersuchungen der reklamierten Käse und der dazugehörigen Roh-, Hilfs- und Zusatzstoffe konzentrierten sich auf den mikrobiologischen Nachweis der Gesamtkeimzahl, aerober und anaerober Sporenbildner, die Gruppe der Coliformen Keime und den Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen.

In Tabelle 2-4 sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

Ausschlaggebend für die Fetakäsequalität vom Gesichtspunkt der Rohware waren das Magermilchpulver und die eingesetzte  $\text{CaCl}_2$ -Qualität.

Wichtigste Quelle für das Vorhandensein von aeroben und anaeroben Sporenbildnern im Endprodukt schien das Magermilchpulver zu sein.

Gesamtkeimzahl und Coliforme Keime waren innerhalb der Prozessabschnitte normal und durch die Erhitzungsschritte im akzeptablen Bereich.

$\text{CaCl}_2$  der Quelle 1 (Tab. 2) war mit 10 KbE Hefen/g belastet. Da dieser Hilfsstoff nach dem 2. Hitzebehandlungsschritt zugegeben wurde, kann dies als Ursache für die Hefekontamination des Fetakäse nach der Verpackung angesehen werden (Abdel-Fatah et al. ,1998).

Die mikrobielle Kontamination mit Hefen, der geblähten Fetakäseproben, wurde als *Kluyveromyces spp.* identifiziert.

Bei den aeroben Sporenbildnern wurden *Bacillus subtilis* (51,4%), *Bacillus fastidiosus* (5,7%) *Bacillus pumilus* (20%) und *Bacillus firmus* (17,1%), bei den anaeroben Sporenbildner wurden *Clostridium paraputrificium* (8,6%) und *Clostridium tertium* (5,7%) nachgewiesen und identifiziert (Abdel-Fatah et al.,1998).

Diese Ergebnisse belegen, dass die Erhitzungsschritte des Herstellprozesses und die Qualität der Rohware einen wesentlichen Einfluss auf die Endproduktqualität haben.

Tab. 2: Mikrobiologischer Keimgehalt (KbE/g) von Roh- Hilf- und Zusatzstoffen für die Fetakäseproduktion nach Abdel-Fatha et al. (1998)

Keimart	Magermilch-pulver	Butteröl	Salz (NaCl)	Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> ) Quelle1 Quelle 2	Wasser	Lab	Gluconodelta-Lakton (GDL)	Phosphorsäure
Gesamtkeimzahl	7,6x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>2</sup>	1,22x10 <sup>3</sup> 4x10 <sup>1</sup>	4x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>1</sup>	n.n	n.n
Aerobe Sporenbildner	3,2x10 <sup>2</sup>	n.n	2x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup> 4x10 <sup>1</sup>	4x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>1</sup>	n.n	n.n
Anaerobe Sporenbildner	1,1x10 <sup>2</sup>	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n
Coliforme Keime	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n
Hefen	n.n	n.n	n.n	1x10 <sup>1</sup>	n.n	n.n	n.n	n.n

n.n: nicht nachweisbar

Tab. 3: Mikrobiologischer Keimgehalt (KbE/g) von akzeptablen und geblähten Fetakäseproben nach Abdel-Fatha et al. (1998)

Keimart	akzeptabel						gebläht					
	Probe (1)	Probe (2)	Probe (3)	Probe (4)	Probe (5)	Durchschnitt	Probe (1)	Probe (2)	Probe (3)	Probe (4)	Probe (5)	Durchschnitt
Gesamtkeimzahl	1,4x10 <sup>1</sup>	1,75x10 <sup>1</sup>	1,55x10 <sup>1</sup>	2,1x10 <sup>1</sup>	3,4x10 <sup>1</sup>	2,04x10 <sup>1</sup>	10x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>5</sup>	2,3x10 <sup>5</sup>	8,5x10 <sup>5</sup>	1,01x10 <sup>6</sup>
Aerobe Sporenbildner	6	5	8	1x10 <sup>1</sup>	1x10 <sup>1</sup>	8	9x10 <sup>2</sup>	9x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>3</sup>	9,1x10 <sup>1</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	1,83x10 <sup>3</sup>
Anaerobe Sporenbildner	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	3x10 <sup>2</sup>	n.n	6,0x10 <sup>2</sup>	n.n	1,80x10 <sup>2</sup>
Coliforme Keime	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n
Hefen	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	2x10 <sup>2</sup>	n.n	n.n	1,5x10 <sup>2</sup>	n.n	1,7x10 <sup>2</sup>

n.n: nicht nachweisbar

Tab. 4: Wirkung der Verfahrensabschnitte auf die bakterielle Qualität nach Abdel-Fatha et al. (1998)

Nr.	Verfahrensabschnitte	Anzahl der Bakterien in KbE/g			
		Gesamtkeimzahl	Aerobe Sporenbildner	Anaerobe Sporenbildner	Hefen
1	Rohmilch	1,2x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>	1,36x10 <sup>1</sup>	5,3x10 <sup>1</sup>
2	Milch nach Standardisierung	1,33x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	1,28x10 <sup>2</sup>	7,0x10 <sup>1</sup>
3	Hitzebehandlung 85 °C/15s	5,6x10 <sup>3</sup>	9,1x10 <sup>1</sup>	9,0x10 <sup>1</sup>	n.n
4	Nach der UF-Konzentration	7,3x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	6,2x10 <sup>3</sup>	n.n
5	Hitzebehandlung 85 °C/2s	5,0x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>1</sup>	8,3x10 <sup>2</sup>	n.n
6	Feta nach der Verpackung	3,4x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>1</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>1</sup>

### 1.3.3 Nachgewiesene Hauptflora von Fetakäseoberflächen und deren Salzlake

Bintsis et al. (2000) und Tzanetakis et al. (1992) führten mikrobiologische Studien der vorkommenden Mikroflora von Fetakäsen durch, wobei die Milchsäurebakterien der Starterkulturen nicht mit berücksichtigt wurden.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf einen Untersuchungszeitraum während der ca. 60-tägigen Reifungszeit der Fetakäseproben. Der niedrige pH-Wert im Käse (5,19-4,56) und der Salzgehalt der umgebenen Salzlake von >5,9% favorisiert das Wachstum von Lactobazillen neben Enterokokken und Pediokokken.

*Lactobacillus plantarum* (47,8% der Isolate) war die dominierende Spezies, mit einer Keimzahlentwicklung von  $3,9 \times 10^4$ /g im Käsebruch auf  $9,1 \times 10^7$ /g im 30 Tage alten Feta. Diese Milchsäurebakterien spielen eine bedeutende Rolle für die Käsereifung (Tzanetakis et al., 1992; Rantsiou et al., 2008).

Enterokokken wurden in geringen Mengen und oft nur in der Salzlake mit ca.  $10^2$ /g nachgewiesen. Enterokokken gelten als Hygieneindikator für eine mangelnde Hygiene während des Melkens und/oder als mögliche fäkale Kontamination während der Produktion in der Molkerei. Sie zählen nicht zur Hauptflora von Feta, müssen aber wegen ihrer Resistenz gegenüber Salz, Säure und Hitze beachtet werden.

Andererseits spielen *Enterococcus* spp. (*Enterococcus faecium*) auch in hoher Anzahl eine nützliche Rolle bei der Reifung verschiedener Käsesorten wegen ihrer proteolytischen Aktivität und Säureproduktion (Bintsis et al., 2000; Öner et al., 2006; Nascimento et al., 2008).

### 1.3.4 Sekundärflora und pathogen Keime

Laktokokken wurden nur im Käsebruch und fünf Tage altem Käse nachgewiesen. Die Abnahme und Hemmung der Laktokokken während der Reifungszeit ist auf den niedrigen pH-Wert und/oder den hohen Salzgehalt zurückzuführen. Dasselbe Phänomen gilt für Coliforme Keime und Staphylokokken, bei denen Säure und Salzgehalt im Käse und der umgebenen Salzlake schnell reduzierend und letal wirken (Bintsis et al., 2000).

**Hefen** zählen normalerweise nicht zu der dominierenden Mikroflora im Fetakäse; da aber hohe Kontaminationsgehalte verzeichnet werden, zählen sie zur **Hauptsekundärflora** im Feta und anderen Weichkäsen in Salzlake (Bintsis et al., 2000; Hayaloglu et al., 2002).

Pereira-Dias et al. (2000) untersuchten die Hefeflora von aus Rohmilch hergestellten portugiesischen Schafkäsen und isolierten 344 Hefe-Stämme von der Käseoberfläche während der 60tägigen Reifezeit. Die hauptsächlich vertretenen Spezies waren *Debaryomyces hansenii* und *Candida intermedia*.

Das Vorhandensein von Hefen hat einerseits einen positiven Effekt auf die Geschmacksentwicklung, andererseits kann es zu Geschmacksfehlern durch die Hydrolyse des Milchfettes, wie „fruchtig“, „bitter“, „hefig“, „offener Geschmack“ kommen; oft begleitet von Missfarbigkeit und offener Textur durch Gasbildung (Oehmichen, 2002).

Die Hefepopulation in sardischen Fetakäsen wurde durch Fadda et al. (2001) untersucht. Von zwei qualitativ unterschiedlichen Molkereien wurden Käseproben untersucht. Es handelte sich dabei um solche guter Qualität und im anderen Fall um Käse mit schleimiger Oberfläche und Bombagen.

Molkerei A erreichte zwischen  $10^2$ - $10^4$  Hefen/g, wobei Molkerei B mehr als  $10^4$  Hefen/g erreichte. Bei Molkerei A fand man 9 Spezies wobei *Kluyveromyces* (*K.*) *lactis* dominant zu 95,2%, *D. hansenii* zu 76,2% und *Dekkera anomala* zu 28,6% vorhanden war.

In Molkerei B dominierte *D. hansenii* zu 93% in einer hohen Anzahl zwischen  $10^4$ - $10^8$ /g. Weiterhin wurde *K. lactis* und *Geotrichum candidum* isoliert. *K. lactis* ist als Haupt-Gasbildner in Milch- und Milchprodukten bekannt, da sie Lactose fermentieren kann.

Bei türkischem Weichkäse in Salzlake wurden folgende mikrobiologische Verhältnisse gefunden: Während der Reifungszeit blieb die Zahl der gefundenen Enterokokken konstant, wobei die Anzahl der Coliformen Keime, Mikrokokken und Staphylokokken abnahm (Hayaloglu et al., 2002).

Untersuchungen von Erkmen (1996) zeigten, dass die Anzahl von *Yersinia enterocolitica* und *Staphylococcus aureus* während des Käseherstellungsprozesses anstieg, aber während der späteren Lagerung und Reifung in Abhängigkeit von der Reifungszeit, Salzkonzentration und Starterkulturaktivität abnahm.

*Listeria monocytogenes* wurde von 13,4 % der kommerziell hergestellten türkischen Weichkäse isoliert. Diese Keimart wurde während der Herstellung, Reifungszeit und auch noch 3 Monate nach Lagertemperatur bei 4°C nachgewiesen. Selbst 18 Wochen Reifungszeit und eine Lagerzeit von 20 Wochen bei 4°C überlebte *Listeria monocytogenes* im Käse und stellte so eine gesundheitliche Gefährdung dar (Erkmen, 2001).

Papadopoulo et al. (1993) berichteten, dass das Wachstum von *Salmonella* in Fetakäse während der Reifung bei 17-18°C nicht unterdrückt werden konnte, aber partiell gehemmt wurde durch die Reifung bei 4°C.

Das Überleben pathogener Keime in Feta und Weichkäsen in Salzlake ist abhängig von den Umgebungsbedingungen, wie Temperatur, hygienischen Bedingungen, Salzkonzentration, Starterkulturaktivität und –zusammensetzung und die Ausgangsbelastung der Käsereimilch (Tzanetakis et al., 1991; Erkmen, 2001; Hayaloglu et al., 2002).

## 2 Hefen

### 2.1 Entwicklung von Hefen während der Herstellung, Reifung und Lagerung von Fetakäsen und deren Auswirkungen

Im Allgemeinen enthalten Käse deutliche Konzentrationen an Milchsäure und geringere Mengen an Zitronen- und Essigsäure. Während des Reifeprozesses stellt der Metabolismus dieser Säuren durch Hefen eine Schlüsselreaktion dar. Er führt zu einer Abnahme der Säure im Produkt, damit zu einem Anstieg des pH-Wertes und in Folge zum Wachstum gewünschter und unerwünschter Bakterien (Boekhout et al., 2003).

Die meisten Käse enthalten Salz (NaCl) in Konzentrationen bis zu 15%, was einen starken Einfluss auf den Stoffwechsel von Hefen mit organischen Säuren haben kann.

Roostita et al. (1999) isolierten 26 Hefe-Spezies aus Käsen mit einem NaCl-Gehalt bis zu 15%. Das stärkste Wachstum in Anwesenheit von Milch- und Zitronensäure, bei bis zu 15% Kochsalz, zeigte dabei *Debaryomyces* (*D.*) *hansenii*, wobei das beste Wachstum mit 0-5% Kochsalz bei 25°C zu verzeichnen war. Nach *D. hansenii* zeigten *Candida* (*C.*) *famata*, *C. catenulata* und *C. intermedia* das beste Wachstum in Gegenwart von Milch- und Zitronensäure, das jedoch bei hoher Salzkonzentration (10-15%) und niedrigen Temperaturen (10°C) abnahm.

*C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *Cryptococcus* (*Cr.*) *albidus*, *Kluyveromyces* (*K.*) *marxianus* wuchsen sehr schwach, ausschließlich bei 25°C und 0-5% Kochsalz in Gegenwart von Milch- und Zitronensäure.

*Saccharomyces* (*S.*) *cerevisiae* wuchs sehr schwach in Gegenwart von Milchsäure, in Abwesenheit von Kochsalz und wuchs überhaupt nicht in Gegenwart von Zitronensäure.

Generell war die Wachstumsrate und Zellpopulation der Hefen in Gegenwart von Kochsalz abnehmend.

Tzanetakis et al. (1998) isolierten 188 Hefe-Stämme von Fetakäseoberflächen. *Saccharomyces cerevisiae* (47,9% der Isolate) war dabei die dominierende Spezies auf der Käseoberfläche, dies ist wahrscheinlich auf kontaminiertes Salz zurückzuführen.

In großer Anzahl wurde *Debaryomyces hansenii* (30,9%) gefolgt von *Pichia farinosa* (11,2%) gefunden. Weiterhin wurden in geringerer Anzahl Stämme wie *C. intermedia*, *C. tropicalis*, *C. versatilis*, *C. catenulata*, *Pichia membranaefaciens*, *S. kluyveri* und *Kluyveromyces marxianus* nachgewiesen.

Die meisten Stämme wachsen bei Anwesenheit von 7,5% bis zu 15% NaCl.

Eine wichtige Rolle während der 60tägigen Reifungszeit spielt das enzymatische Profil der Hefen, wobei die Aktivität zweier Enzyme besonders hervorzuheben ist, die Aminopeptidase- und Esteraseaktivität.

Die Ergebnisse von Tzanetakis et al. lassen darauf schließen, dass salzresistente Hefen, in großer Anzahl auf der Käseoberfläche, die Käsereifung durch enzymatisch hydrolisierte Peptide sowie durch Esterase- und Esterase-Lipase-Aktivität steuern. Die Rolle der Hefen basiert ebenfalls auf den Interaktionen zwischen Hefen und Starterkulturen, proteolytischer und lipolytischer Aktivität, Aromabildungsvermögen einzelner Arten und derer Stoffwechselprodukte.

Bintsis et al. (2003) untersuchten in einer Studie die Protease-, Peptidase- und Esteraseaktivität von aus Fetakäse-Salzlake isolierten Hefen. Auf der Käsoberfläche wuchsen während der Reifung bei 16°C Hefen in einer Größenordnung zwischen  $10^5$  –  $10^7$  Hefen /g.

*S. cerevisiae* und *D. hansenii* stellen dabei die hauptsächlichsten Vertreter dar. *D. hansenii* und *S. cerevisiae* besitzen hauptsächlich Aminopeptidase- und Carboxypeptidase- Aktivität. Es wurde ein geringes Ansteigen der freien Aminosäuren in Milch beobachtet, wenn diese mit *D. hansenii* oder *S. cerevisiae* beimpft wurde.

*D. hansenii* kann in Milch die Aminosäuren Glu, Gly, Arg, Pro und Ala freisetzen. *D. hansenii* wurde als Kultur der Salzlake zugesetzt, was zu einem Anstieg der freien Aminosäuren nach 60 Tagen Reifezeit führte im Vergleich zum Kontroll-Käse ohne Zusatz.

Die Proteolyse wird als Schlüsselprozess in Bezug auf Geschmacks- und Texturentwicklung in den meisten Käsevariationen angenommen. In Feta und ähnlichen Salzlakekäsen wird die Lipolyse gleichermaßen als wichtig erachtet. Das Freisetzen der Fettsäuren von Lipiden aus der Käsoberfläche, kann die Geschmacksentwicklung steuern. Essigsäure, die dominierende freie Fettsäure in Feta, ist für die Entwicklung des charakteristischen Geschmacks „leicht ranzig“ von Feta verantwortlich, durch die Freisetzung höherer Fettsäuren.

Hefen haben eine große hydrolytische Aktivität, aber der exakte Entwicklungsweg der Geschmackskomponenten kann nur mit genau definierten zugesetzten Kulturen und dem Zusatz einer sterilen Salzlake zur „kontrollierten“ Reifung erfolgen.



### 3 Staphylokokken

#### 3.1 Bedeutung von *Staphylococcus aureus* in Lebensmitteln

Bei Bakterien der Gattung Staphylokokken handelt es sich um grampositive, fakultativ anaerobe, Katalase-positive Kokken, die eine Vielzahl an Virulenzfaktoren bilden können. Sie stellen nur geringe Ansprüche an Temperatur, pH und  $a_W$ -Wert (Siehe Tabelle 5).

Tab. 5: Wachstumsbedingungen und Toxinproduktion von *Staphylococcus aureus* nach Eickhoff (2005)

Parameter	Wachstumsbedingungen	Toxinbildung
Temperatur	7-48°C (Optimum: 37°C)	10-48°C (Optimum: 40-45°C)
pH Wert	4-10 (Optimum: 6-7,0)	4-9,6 (Typ A: pH 7-8)
$a_W$ -Wert (aerob)	0,38->0,99	0,85->0,99 (Optimum: 0,98)
Toleranz gegenüber hohen Salzkonzentrationen ( bis zu 20% NaCl). Bei aerobem Wachstum liegt die Toxinproduktion deutlich höher als unter anaeroben Bedingungen. Resistenz gegen viele Desinfektionsmittel und Antibiotika.		

30-50% aller Staphylokokken-Spezies sind Toxinbildner. Vor allem der Koagulase-positive *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) zählt zu dieser Gruppe.

Staphylokokken gehören zur natürlichen Flora der Haut und Schleimhaut von Mensch und Tier. Die Trägerrate besonders im Nasenrachenraum variiert bei Erwachsenen zwischen 15% und 40%. Medizinisch haben sie eine Bedeutung als Eitererreger. Ausgangspunkt der Infektionskette kann daher bei mangelnder Hygiene der Mensch sein, der über Haut, Haare, Niesen oder eitrige Wunden Lebensmittel kontaminiert. Auch eine intravitale Kontamination eines Lebensmittelliefernden Tieres (z.B. Staphylokokken-Mastitis) ist möglich. Eine Vermehrung und Toxinbildung von Staphylokokken wird durch einen hohen Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Wassergehalt des Lebensmittels (z.B. Milch und Milchprodukte) bei mittleren Temperaturen begünstigt (Eickhoff, 2005).

Nach Heeschen (2004) sind für das Entstehen einer Staphylokokken-Intoxikation folgende Faktoren bestimmend:

- Für eine Erkrankung sind Keimzahlen von etwa  $10^6$ /g Lebensmittel erforderlich.
- Die meisten Lebensmittelvergiftungen werden durch den Typ A hervorgerufen.
- Für ihre Vermehrung benötigen Staphylokokken Aminosäuren und B-Vitamine. Begünstigend wirken ein hoher Eiweiß-Wassergehalt und mittlere bis warme Temperaturen.
- Temperaturen von 40-45°C, pH-Werte zwischen 7 und 8, ein  $a_W$  Wert von 0,98 und aerobe Verhältnisse begünstigen die Toxinbildung.

- Die Staphylokokken-Zellen sind gegenüber Wärmeeinwirkung relativ empfindlich. Sie werden durch die amtlich vorgeschriebenen Bedingungen der Pasteurisation inaktiviert. Enterotoxine sind demgegenüber weitgehend thermoresistent.
- Durch Kochtemperaturen wird das A-Toxin nicht zerstört, jedoch durch Autoklaviertemperaturen von 126,7°C innerhalb von 8 Minuten. Enterotoxin B wurde bei deutlich niedrigeren Temperaturen inaktiviert.

### **3.2 Nachweis von *Staphylococcus aureus* in Salzlake und den entsprechenden Käseoberflächen**

Nach Zangerl et al. (2001) stellt die Rohmilch das wichtigste Reservoir für Staphylokokken in Rohmilchprodukten und insbesondere Rohmilchkäse dar. *Staphylococcus aureus* zählt zu den häufigsten Erregern von klinischen und subklinischen Mastitiden bei Kühen, Schafen und Ziegen. Üblicherweise liegt die Ausscheidungsrate bei etwa  $10^4$  KbE/ml. Eine Kontamination der Rohmilch ist aber auch durch das Melkpersonal bei Wundinfektionen oder über die Melkgeräte bzw. die direkte Umgebung möglich.

Über Lebensmittelvergiftungen durch *Staphylococcus aureus* wurde auch in den letzten 20 Jahren berichtet. Hierbei waren Frischkäse aus Rohmilch auffällig, die nur mit Lab ohne Säuerungskultur hergestellt wurden (Jermini et al., 1990). Hauptursache für die Lebensmittelvergiftungen durch Käse war die Verarbeitung von Rohmilch, die mit hohen Zahlen an enterotoxinogenen *S. aureus* kontaminiert war, in Verbindung mit einer ungenügenden Säuerung.

*S. aureus* Keimzahlen im Käse sind – neben der Säuerungsgeschwindigkeit am Beginn des Herstellprozesses – in erster Linie abhängig von der Käsesorte (Technologie), von der Art der verarbeiteten Milch (Rohmilch/thermisierte oder wärmebehandelte Milch) und von den Kontaminationsmöglichkeiten während des Verarbeitungsprozesses (offenes/geschlossenes System).

Nach Asperger (1991) ist die Entwicklung von *S. aureus* in Rohmilchkäsen während der Käsung und Reifung im Wesentlichen abhängig von:

- der Ausgangskeimzahl der Verarbeitungsmilch,
- der Säuerungsgeschwindigkeit,
- der Nachwärmtemperatur,
- der Reifungszeit bzw. –temperatur,
- dem pH-Wert Verlauf während der Reifung.

Während der Käseherstellung reichern sich die in der Milch enthaltenen Staphylokokken durch die physikalische Konzentrierung im Bruch um etwa das 10-fache an. Weiterhin ist eine Vermehrung im Kessel und in der Form bzw. auf der Presse innerhalb der ersten 24 Stunden möglich, bis der pH-Wert und die von den Startern gebildeten Säuren eine weitere Vermehrung unterdrücken. Die antagonistische Wirkung der Säuerungskulturen korreliert eng mit der gebildeten Menge an organischen Säuren und damit dem pH-Wert (Asperger, 1986).

Mikrobiologische Studien über die Mikroflora von Salzlakenkäse aus Ziegenrohmlach, während der Herstellung und der Lagerung, wurden von Litopoulou-Tzanetaki (1992) veröffentlicht. Dabei wurde die Zusammenwirkung von pH-Wert und Salzlakenkonzentration auf die meisten vorkommenden Mikroorganismen erkannt. Ein pH-Wert Bereich von 4,15-4,50 und ein Ansteigen der Salzkonzentration auf bis zu 6,21% in 90 Tage alten Käsen bewirkten eine Reduzierung der meisten vorkommenden Mikroorganismen, wobei eine rapide Reduzierung von *Staphylococcus aureus* auf der Käseoberfläche von  $1,6 \times 10^2/\text{g}$  auf  $1,0 \times 10^1/\text{g}$  zu verzeichnen war.

#### 4 Aufgabenstellung

Aufgrund der marktwirtschaftlichen Bedeutung wird Fetakäse nicht nur in den traditionellen Regionen sondern weltweit produziert. Durch den Import von Fetakäsen lagern in den Regalen der Handelsketten Käse unterschiedlicher Qualität, die sich auch in den sensorischen Eigenschaften niederschlägt.

Neben den mikrobiologischen Eigenschaften, die ein sicheres Lebensmittel mindestens bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum garantieren soll, sollte auch die Genusstauglichkeit bis dahin gegeben sein.

Werden Käse importiert, ist der Händler verpflichtet im Rahmen von HACCP die Verkehrsfähigkeit zu überprüfen. Das erfolgt nicht nur bei frisch eingeführten Lebensmitteln. Gerade bei Fetakäse, für den eine Mindesthaltbarkeitsdauer von über drei Monaten bis zu fast einem Jahr vom Hersteller bescheinigt wird, muss über den längeren Zeitraum die Verkehrsfähigkeit geprüft werden.

Hier besteht das Problem - wenn keine klaren mikrobiologischen Grenzwerte festgelegt sind - einzuschätzen, ob von einer erhöhten Anzahl bestimmter Keimarten eine Gefahr für den Verbraucher ausgeht, oder ob nur sensorische Abweichungen zu erwarten sind.

Die Kühl- und Lagerbedingungen sind ein weiteres Kriterium für die Qualität eines Lebensmittels über einen längeren Zeitraum.

Im Rahmen dieser Arbeit soll innerhalb einer MHD-Überprüfung der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen während der Lagerung von Fetakäsen auf die Entwicklung der Hefen- und Staphylokokkenpopulation und die damit verbundene eventuelle sensorische Beeinflussung untersucht werden. Die sichere Identifizierung oben genannter Mikroorganismen mittels geeigneter Methoden steht dabei im Vordergrund.

Weiterhin soll der Einfluss der Salzlake bei unterschiedlichen Temperaturen auf den Kontaminationskeim *Staphylococcus aureus* untersucht werden. Dazu sollen frisch hergestellte Fetakäse mit *Staphylococcus aureus* in der Salzlake gezielt kontaminiert und dessen Wachstumsverhalten innerhalb der Reifezeit überprüft werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem p.A.-Reinheitsgrad. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien (Fa. VWR Darmstadt) in sterilem *aqua bidest.* angesetzt:

- Silbernitrat-Maßlösung,  $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$ , Salpetersäure  $w(\text{HNO}_3) = 65\%$ ,  $\rho_{20} = 1,40 \text{ g/cm}^3$  für die Chloridbestimmung von Käse und der Salzlake,
- Milchsäure 90%ig zum Einstellen des pH-Wertes der Salzlake,
- Restriktionsenzyme und –puffer von MWG –Biotech AG, München,
- Bactident<sup>®</sup> Coagulase zum Nachweis des von *Staphylococcus aureus* gebildeten Enzym Koagulase.
- Die Chemikalien für die biochemischen Test für die Hefen- und Staphylokokkenidentifizierung (NIT1, NIT2, VPA, VPB, FB) wurden von der Fa. Bio Merieux<sup>®</sup> bezogen.

### 5.2 Geräte

- pH-Meter 765 Calimatic, Knick, Berlin
- SM-Titrino 702, Metrohm AG, Schweiz
- Moulinette
- Stomacher
- Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, (sofern nicht anders angegeben wurde immer unter folgenden Bedingungen zentrifugiert: 12000 rpm, 4°C, 2 min)
- Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
- Gene-Amp-PCR-System 9600, Perkin Elmer, Überlingen
- CHEF-DRII- System, Bio-Rad, München
- Transilluminator TFL-20 M, Biometra, Göttingen
- Video Copy Prozessor, Mitsubishi, Tokyo, Japan
- API Lab Software zur Keimidentifizierung, BioMerieux<sup>®</sup>, Frankreich

### 5.3 Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien waren Fertignährmedien von der Fa. VWR (Merck) Darmstadt und wurden mit *aqua demin.* hergestellt.

- YGC Agar 40,0g/l  
Fertignährboden  
Sterilisation des gelösten Nährmediums bei 121°C / 15 min
- Sabouraud 2%Dextrose Agar 47,0g/l  
Fertignährboden  
Sterilisation des gelösten Nährmediums bei 121°C / 15 min
- CASO-Agar 40,0g/l  
Fertignährboden  
Sterilisation des gelösten Nährmediums bei 121°C / 15 min

- Baird Parker Agar (Basis) 58,0g/0,95l  
Fertignährboden  
Sterilisation des gelösten Nährmediums bei 121°C / 15 min
- Eigelb-Tellurit-Emulsion 20%  
Emulsion: 50 ml Zugabe auf 950ml Basismedium (ca. 45°C temperiert)
- Hirn-Herz-Bouillon 37,0g/l  
Fertigmedium  
Sterilisation des gelösten Nährmediums bei 121°C / 15 min
- Blut-Agar (Basis) 40,0g/l  
Fertignährboden  
Sterilisation des gelösten Nährmediums bei 121°C / 15 min
- Defibriniertes Schafblut  
Fertiglösung: 50ml Zugabe auf 1,0l Basismedium (ca. 45°C temperiert)

#### 5.4 Verwendete Fetakäse aus dem Handel

Die Fetakäse wurden aus dem Handel gekauft. Mengenmäßig wurde soviel Käse benötigt, dass für jede Lagertemperatur zu jedem Untersuchungszeitraum ein kompletter Käse für die Untersuchungen und 1 kompletter Käse für die Sensorik zur Verfügung stand. Gleiches MHD innerhalb der jeweiligen Fetakäse konnte dabei sichergestellt werden, die gleiche Lot-Nr. dazu jedoch nicht immer über den kompletten Zeitraum.

<b>Fetakäse aus dem Handel</b>	<b>Bezeichnung:</b>
1. Bulgarischer Fetakäse	D 1
2. Griechischer Fetakäse	D 2
3. Französischer Fetakäse	D 3
4. Holländischer Fetakäse	D 4
Zu 1) In Salzlake gereift, hergestellt in Bulgarien, abgepackt in Griechenland Genusstauglichkeitszeichen: war deklariert Abpackung: Folie verschweißt, 200g 7 Monate vor MHD	
Zu 2) In Salzlake gereift, aus Schaf- und Ziegenmilch, mind. 48% FiT., max. 56% Feuchtigkeit Genusstauglichkeitszeichen: war deklariert Abpackung: Folie verschweißt, 200g 5 Monate vor MHD	
Zu 3) Französischer Fetakäse (Salakis) In Salzlake gereift, aus 100 % Schafsmilch, 50% FiT. Genusstauglichkeitszeichen: war deklariert	

Abpackung: Folie verschweißt, 200g 3 Monate vor MHD
Zu 4) In Salzlake gereift, 45% FiT. Genusstauglichkeitszeichen: war deklariert Abpackung: Dose, 720g Einwaage, Abtropfgewicht: 400g 6 Monate vor MHD
<b>Untersuchungsbedingungen und Untersuchungsrythmus</b>
I Anfangskontrolle Start
Sensorik, pH-Wert, Salzgehalt, Quantitativer Nachweis, Hefen und Staphylokokken und deren Feindifferenzierung
II Lagertest
Temperaturen: 6°C (Bezeichnung: a), 15°C (Bezeichnung: b), 25°C (Bezeichnung: c)
Zeitraum der Untersuchungen in folgenden Abständen: nach 3, 10, 18, 43, 60 Tagen, Ende MHD, 1 Monat nach MHD
Untersuchung auf: Sensorik pH-Wert Salzgehalt Nachweis Hefen und Staphylokokken quantitativ und Feindifferenzierung

#### 5.4.1 pH-Wert-Bestimmung

Von allen Käseproben und dazugehörigen Salzlaken wurde der pH-Wert elektrometrisch gemessen (pH-Meter 765 Calimatic).

Die Käseproben wurden aus der Salzlake genommen, kurz zum Abtropfen in einen Trichter mit Faltenfilter gestellt und danach in einer gereinigten und trockenen Moulinette gleichmäßig gemischt. Von dieser Mischprobe wurde das arithmetische Mittel zweier Messungen auf zwei Stellen nach dem Komma angegeben (Wiederholbarkeit  $r_{ci}=0,02$ ).

Die dazugehörigen Salzlaken wurden separat in Schraubverschlussflaschen gefüllt und wie oben beschrieben elektrometrisch gemessen.

#### 5.4.2 Bestimmung des Salzgehaltes

Zur Bestimmung des Salzgehaltes wurde das potentiometrische Verfahren (VDLUFA Methodenbuch Bd. VI, Methode C 10.6.3 „Bestimmung des Chloridgehaltes von Käse“, 6. Ergänzung 2003, angewendet (Titriereinheit SM Titrino, Schweiz).

Alle Käseproben wurden wie in 6.4.1 beschrieben mit Hilfe einer Moulinette gleichmäßig gemischt und von dieser Mischprobe ca. 1 g in 55°C warmem *aqua demin.* suspendiert und mit Salpetersäure angesäuert. Anschließend wurden die Chlorid-Ionen mit Silbernitrat-Maßlösung titriert. Die Endpunktbestimmung erfolgte potentiometrisch.

Der Chloridgehalt  $W_{Cl^-}$  in % wird nach folgender Formel berechnet:

$$W_{Cl^-} = \frac{3,5453(V_1 - V_0) \times 100}{\text{Einwaage}[g] \times 1000} [\%]$$

Der Kochsalzgehalte  $W_{NaCl}$  in % wird nach folgender Formel berechnet:

$$W_{NaCl} = \frac{5,8443(V_1 - V_0) \times 100}{\text{Einwaage}[g] \times 1000} [\%]$$

$V_1$  = für die Bestimmung verbrauchte ml Silbernitrat-Maßlösung

$V_0$  = für den Blindwert verbrauchte ml Silbernitrat-Maßlösung

Die Salzgehaltangaben ergeben sich aus dem arithmetischen Mittel von Doppelbestimmungen mit einer Wiederholbarkeit  $r_{NaCl}=0,02\%$

Für die Bestimmung der Salzgehalte der Salzlaken gilt oben beschriebene Vorgehensweise.

### 5.4.3 Sensorische Bewertung

Da die Qualitätswettbewerbe für Lebensmittel auf einer sensorischen Analyse gemäß der bewertenden Prüfung mit Skale (DIN 10 952-1+2:1983) basieren und in der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Krefeld Sensorische Sachverständige zur sensorischen Beurteilung zur Verfügung standen, wurde nach dem 5 Punkte Prüfschema bewertet.

Die Bewertung erfolgt anhand festgelegter Merkmale und Merkmalseigenschaften, die in den produktspezifischen Bewertungstabellen beschrieben und gleichzeitig bewertet werden. Nach diesen DLG-Prüfbestimmungen wurde der Fetakäse beurteilt. Dazu wurde der Käse 24h vorher auf 6-8°C gekühlt und vor der sensorischen Bewertung auf 15°C temperiert.

## 5.5 Charakterisierung der Hefen und Staphylokokken im Lagertest

### 5.5.1 Bestimmung der Keimzahlen (Kolonie bildende Einheiten)

Die Angaben der Keimzahlen (Kolonie bildende Einheiten pro g/ml) beziehen sich auf Einzelbestimmungen. Bei Abweichungen, wenn es sich um Mittelwerte aus X Bestimmungen handelt, wird im entsprechenden Kapitel darauf hingewiesen.

#### Nachweis der Hefen

Der Fetakäse wurde unter sterilen Bedingungen aus der Salzlake genommen und von der abgetropften Probe 10g Einwaage mit steriler Natriumcitratlösung homogen im Stomacher vermischt. Mittels Spatelverfahren wurde die Anzahl der koloniebildenden Hefen/g bestimmt. Die Verdünnungsreihe erfolgte in ¼ starker Ringerlösung in dezimalen Schritten. Zwei Petrischalen mit jeweils 0,1 ml der einzelnen Verdünnungsstufen wurden im Spatelverfahren auf YGC Agar gespatelt und 4 Tage bei 25°C bebrütet.

Die Salzlake wurde in sterile Schraubverschlussflaschen gefüllt, mit ¼ starker Ringerlösung wie oben beschrieben verdünnt und im Spatelverfahren angesetzt.



### Nachweis der Staphylokokken

Die Probenahme wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Verdünnungsreihe erfolgte in  $\frac{1}{4}$  starker Ringerlösung in dezimalen Schritten. Zwei Petrischalen mit jeweils 0,1 ml der einzelnen Verdünnungsstufen wurden im Spatelverfahren auf Baird Parker Agar ausgespatelt, bei 37°C bebrütet und nach 24h und nach 48h auf typische und untypische Kolonien kontrolliert und ausgezählt. Nach 48 h wurden je 5 typische und je 5 untypische Kolonien in Hirn-Herz-Bouillon überimpft. Nach 24h Bebrütungszeit bei 37°C wurde davon 0,1 ml in 0,3 ml Bactident Coagulase geimpft, bei 37°C bebrütet und nach 6 h auf Verklumpung überprüft. War keine Verklumpung feststellbar, wurde die Bebrütungszeit auf 24 h erweitert. Danach erfolgten die Gesamtauswertung und die prozentuale Berechnung auf Koagulase- positive und Koagulase-negative Staphylokokken.

## **5.5.2 Isolierung und Differenzierung**

Alle bewachsenen und im auszählbaren Bereich liegenden koloniebildenden Einheiten (Hefen und Staphylokokken) wurden einer optischen und mikroskopischen Kontrolle unterzogen. Es wurde das Aussehen auf dem Agar beurteilt, ein Lebendpräparat bei den Hefen und eine Gramfärbung bei den Staphylokokken vorgenommen. Danach wurden Hefen auf Sabouraud-Dextrose-Agar und Staphylokokken auf CASO- und Blutagar fraktioniert ausgestrichen und entsprechend (Hefen bei 25°C, 24-48h und Staphylokokken bei 37°C, 24h) bebrütet. Die frischen Einzelkolonien wurden dann weiter identifiziert, bzw. in die Stammsammlung auf Schrägkulturröhrchen überimpft und in Kryoröhrchen überführt.

## **5.5.3 API Identifizierungssystem**

### **5.5.3.1 System zur Identifizierung von Hefen ID 32 C**

Zur einfachen Identifizierung der isolierten Hefen wurde ID 32 C, ein standardisiertes miniaturisiertes System (BioMerieux, Nürtingen) anhand von 32 Assimilationsreaktionen und einer Datenbasis verwendet. Das System besteht aus Streifen mit 32 Vertiefungen, die Kohlenhydrate in dehydrierter Form enthalten. Nach Herstellen einer Keimsuspension entsprechend dem Trübungsstandard McFarland 2 wurden die Vertiefungen mit 135µl beimpften API® C Medium pipettiert und 48h bei 30°C bebrütet. Die Ablesung erfolgte anhand einer deutlichen Trübung gegen eine Wachstumskontrolle (0). Anhand der Positivreaktion (Trübung) wurden die Hefen mit Hilfe der speziellen Auswertesoftware identifiziert.

Alle isolierten Hefen im Lagertest während der MHD Kontrollen wurden untersucht.

Weiterhin wurde die Morphologie der Zellen betrachtet.

### **5.5.3.2 System zur Identifizierung von Staphylokokken ID 32 STAPH**

Alle isolierten Staphylokokken aus dem Lagertest während der MHD-Kontrollen wurden mit dem ID 32 STAPH (BioMerieux, Nürtingen) untersucht. Auch dieses System besteht aus Streifen mit Vertiefungen in denen 26 dehydrierte Substrate enthalten sind. 55µl Bakteriensuspension entsprechend dem Trübungsstandard

McFarland 0,5 wurde in die Vertiefungen pipettiert, nach Überschichten der Vertiefungen URE (Harnstoff), ADH (L-Arginin) und ODC (L-Ornithin) mit 2 Tropfen Paraffinöl, 24h bei 36°C aerob bebrütet.

Die Substrate der Reihe 0 mussten vor Ablesen der Reaktion mit speziellen Reagenzien (siehe 6.1) versetzt werden.

Die Reaktionen wurden anhand einer Ablesetabelle als numerisches Profil codiert. Anhand des 9 stelligen Profils wurden mit Hilfe der Identifizierungssoftware die Staphylokokken identifiziert. Die Morphologie der Zellen wurde betrachtet.

#### 5.5.4 Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis (ARDRA) Hefen

Für die Identifizierung der Hefen wurde ARDRA nach Wyder et al. (1997) angewendet. Bei dieser Methode wird ein Bereich der 18S rDNA, 5.8S und einen Teil der 28S rDNA umfasst, mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die eingesetzten Universalprimer sind komplementär in einem Bereich der 18S rDNA und der 28S rDNA. Das gebildete Amplifikationsfragment sollte eine ungefähre Länge von 550-850 bp aufweisen. Dieses Fragment wurde anschließend mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, um die Hefearten identifizieren zu können.

##### 5.5.4.1 Probenvorbereitung und Zellaufschluss für Hefen

- Die Hefen auf Schrägkultur (Sabouraud Dextrose Agar) frisch überimpfen.
- In 1,0 ml aqua bidest. ca. 50mg Koloniematerial abnehmen und mit Hilfe des Vortexers vermischen (Lösung muss milchig trüb sein).
- In Eppendorf-Centrifuge 5402 Reaktionsgefäße mit Lösung geben, zentrifugieren bei 12000 rpm/ 2 min., bei 4°C.
- Überstand abpipettieren.
- Verbleibendes Produkt mit 300µl PCR Puffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5) resuspendieren und gut mischen.
- In 2,0 ml sterile trockene Schraubverschlussgefäße mit 0,3g Glasperlen (0,10-0,11 mm Durchmesser) überführen.
- Incubieren für 1 Stunde/65°C, bei 400rpm/min (zwischenzeitlich Umdrehungszahl runterfahren und wieder hochfahren, ca. 2x innerhalb der Stunde).
- Aufschluss oberhalb der Glasperlen abpipettieren, in 1,5 ml Reaktionsgefäße geben und über Nacht in den Gefrierschrank stellen.

##### 5.5.4.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Verwendete Puffer:

Verdünnungspuffer:

**10x TE-Puffer:**

Tris 12,11 g/l

Na-EDTA 3,70 g/l

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,0 eingestellt. Der Puffer wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert und vor dem Einsatz 1:10 mit *aqua bidest.* verdünnt.

Laufpuffer für die Gelelektrophorese:**10x TAE Puffer:**

Tris	48,40 g/l
Na-EDTA	7,45 g/l
Na-Acetat-Trihydrat	6,80 g/l
Eisessig	25,00 g/l

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,85 eingestellt. Der Puffer wurde 10-fach in *aqua bidest.* angesetzt und vor dem Einsatz 1:10 mit *aqua bidest.* verdünnt.

Für die PCR wurden Universalprimer (Weyder et al., 1997; Vasdinyei et al., 2003) eingesetzt, für 2 ITS Regionen, ITS1-region-NS1 und ITS 2, welche die konservierten Gene für 18S, 5.8S und 28S ribosomale RNA voneinander trennen.

Upstream Primer: 5'-GTA GGT AGT CAT ATG CTT GTC TC-3'

Downstream Primer: 5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'

Das PCR Protokoll wurde nach Hoppe-Seyler et al. (2003) modifiziert. In einem sterilen 0,5ml Reaktionsgefäß wurden 48,1 µl Reaktionsansatz hergestellt:

5µl Puffer	200mM Tris-HCl, 160mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 15mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1% [w/v] Gelatine
8µl dNTP-Gemisch	Nukleotide, Desoxynucleotidtriphosphate 1,25 mM
1µl Tween 20	2,5%
jeweils 25mol/µl Primer	ITS1-regionNS1 und ITS2
1 U Taq-Polymerase	

Zum Reaktionsansatz wurden 1,9µl DNA-Extrakt zugegeben. Dieser Ansatz wurde 3 min auf 95°C erhitzt. Die PCR erfolgte in 35 Zyklen in einem Gene-Amp-PCR-System 9600 unter folgenden Bedingungen:

- 40s bei 95°C (Denaturierung der DNA),
- 40s bei 58°C (Binden der Primer),
- 2,0 min bei 72°C (Elongation am Temperaturoptimum der Taq-Polymerase).

Anschließend wurde 3 min auf 72°C inkubiert („Auffüllen“ der DNA-Stränge durch DNA-Polymerase).

Bei jeder PCR wurde eine Probe ohne Template (ohne DNA und Wasser) zugegeben, um die Reinheit der Reagenzien zu überprüfen.

Nach jedem PCR-Durchgang wurde das Produkt mittels Gelelektrophorese überprüft.

Als Längenstandard wurde λ HindIII bei jedem Elektrophoresegel mitgeführt, um die Menge der Basenpaare an den Banden abzulesen.

### 5.5.4.3 Restriktionsanalyse

Nach Turbett et al. (1996) wurden für den Restriktionsverdau 15-20µl ungereinigte PCR-Fragmente eingesetzt. Ein Gesamtvolumen von 20µl wurde dabei immer eingehalten, welches bei Bedarf mit sterilem TE-Puffer aufgefüllt wurde.

Von den **separat** eingesetzten Restriktionsenzymen (HaeIII und MspI) wurden jeweils 5U und die Puffer nach Angaben des Herstellers zugegeben.

Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 5.5.4.4 Gelelektrophorese

Zum Trennen von Nukleinsäuren (DNA, RNA) besteht die Gelmatrix meist aus Agarose. Dabei handelt es sich um einen langkettigen Zucker aus der Zellwand der Rotalgen. Die beim Restriktionsverdau entstandenen Nukleinsäurefragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose (1,5% [w/v]) wurde in 1xTAE Puffer aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromidlösung (1µg/ml Endkonzentration) zugegeben. Ethidiumbromid lagert sich als Farbstoff in die DNA ein und fluoresziert unter UV-Licht.

In die Gelform wurden die entsprechenden Gelkämme eingesetzt, die Agarose eingefüllt und 30 min ausgehärtet. Nach vorsichtiger Entfernung der Kämme (entstanden sind Taschen) wurde das Gel in die Elektrophoresekammer „unter Puffer“ verbracht. Anschließend wurden jeweils 10µl der Proben in die Taschen eingefüllt. Die Proben mussten vorher für die Gelelektrophorese noch gefärbt und beschwert werden, dazu wurden 3µl Dye-Lösung (Bromphenolblau 0,07% [w/v] und Glycerol 33,0% [v/v]) zugegeben. Ein Längenstandard wurde zum Größenvergleich mit aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Agarosegele unter UV-Licht auf einen Transilluminator blasenfrei aufgelegt und mit einem Video Copy abgelichtet.

### 5.5.5 Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis (ARDRA) Staphylokokken

Für die Isolierung und Identifizierung der Staphylokokken wurde ARDRA nach Vaneechoutte et al. (1992) angewendet. Hierbei wird ein Bereich der 16S rDNA, die 16S-23S intergene Region und ein Teil der 23S rDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert. Mit Universalprimern werden in diesem Bereich gebildete Amplifikationsfragmente mit einer ungefähren Länge von 500 bp erreicht. Separat eingesetzte spezifische Restriktionsenzyme schneiden die Fragmente und ergeben speziesspezifische Schnittmuster.

#### 5.5.5.1 Probenvorbereitung und Zellaufschluss für Staphylokokken

Die Probenvorbereitung wurde nach Hoppe-Seyler et al. (2003) durchgeführt:

- Die Staphylokokken auf CASO-Agar frisch überimpfen.
- 200µl PCR Puffer in Reaktionsgefäße pipettieren.

- Mit steriler Impföse Koloniematerial abnehmen und im Puffer gut resuspendieren (Lösung muss milchig trüb sein).
- Im Thermomixer bei 95°C für 15 min bei 650 rpm schütteln (Zellaufschluss).
- Proben abkühlen lassen.

### 5.5.5.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Verwendete Puffer: siehe 5.5.4.2

Für die PCR wurden Universalprimer (Vaneechoutte et al., 1992) eingesetzt, welche die konservierten Gene für 16S, 23S ribosomale RNA voneinander trennen.

Upstream Primer: 5'-TGG CTC AGA TTG AAC GCT GGC GGC-3'

Downstream Primer: 5'-CCT TTC CCT CAC GGT ACT GGT-3'

Das PCR Protokoll wurde nach Hoppe-Seyler et al. (2003) durchgeführt. In einem sterilen 0,5ml Reaktionsgefäß wurden 48,1 µl Reaktionsansatz hergestellt:

<b>Mastermix pro Isolat</b>	50,0µl
2xPCR Mastermix-Kit	25,0µl
Primer 68	0,3µl
Primer 69	0,3µl
Steriles ention. H <sub>2</sub> O	22,5µl
Ansatzmenge	48,1µl
DNA-Extrakt	1,9µl

Zum Reaktionsansatz wurden 1,9 µl DNA-Extrakt zugegeben. Dieser Ansatz wurde 5 min auf 92°C erhitzt. Die PCR erfolgte in 35 Zyklen in einem Gene-Amp-PCR-System 9600 unter folgenden Bedingungen:

- 1 min bei 93°C (Denaturierung der DNA),
- 2 min bei 58°C (Binden der Primer),
- 2,3 min bei 72°C (Elongation am Temperaturoptimum der Taq-Polymerase).

Anschließend wurde 10 min auf 72°C inkubiert (Auffüllen der DNA-Stränge durch DNA-Polymerase).

Nach jedem PCR-Durchgang wurde das Produkt mittels Gelelektrophorese überprüft.

Als Längenstandard wurde λ HindIII bei jedem Elektrophoresegele mitgeführt, um die Menge der Basenpaare an den Banden abzulesen.

### 5.5.5.3 Restriktionsanalyse

Nach Turbett et al. (1996) wurden für den Restriktionsverdau 15-20µl ungereinigte PCR-Fragmente eingesetzt. Ein Gesamtvolumen von 20µl wurde dabei immer eingehalten, welches bei Bedarf mit sterilem TE-Puffer aufgefüllt wurde. Von dem

eingesetzten Restriktionsenzym (HindIII) wurden jeweils 5U und der Puffer nach Angabe des Herstellers zugegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C.

#### **5.5.5.4 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese für den Staphylokokken-Nachweis wurde wie unter 5.5.4.4 dargestellt durchgeführt.

### **5.6 Stammhaltung und Kultivierung im Kontaminationstest mit *Staphylococcus aureus***

#### **5.6.1 Herkunft**

Zur künstlichen Kontamination von Fetakäsen mit *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* wurde ein Stamm aus der Stammsammlung Herkunft DSM Braunschweig (DSM-Nr. 20231) verwendet. Aus dem Kryoröhrchen wurde auf Blutagar der Stamm ausgerollt und davon eine Schrägkultur auf CASO-Agar angelegt, die als Ausgangskultur zum Beimpfen verwendet wurde. In 3ml steriler Ringerlösung wurde eine hochkonzentrierte Bakteriensuspension mit Hilfe einer sterilen Impföse hergestellt, die dann nach optischem Vergleich mit Mc Farland Standard zum gleichmäßigen Beimpfen der Salzlake entsprechend verdünnt wurde.

#### **5.6.2 Kontaminationsversuche**

##### **5.6.2.1 Technologie zur Herstellung der Fetakäse**

Für die Herstellung der Fetakäse für die Kontaminationsversuche stand die Einrichtung der Lehrmolkerei der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Krefeld zur Verfügung.

In der Abbildung 3 ist in einem Prozessleitplan der technologische Ablauf dargestellt. Die Kontamination der Salzlake erfolgte im Laborbereich der Untersuchungsanstalt.

##### **5.6.2.2 Kontamination der Fetakäse**

In einem sterilen Röhrchen wurden 5 ml ¼ starke sterile Ringerlösung mit *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* vermischt und eine hochkonzentrierte Bakteriendichte nach Mac Farland Standard eingestellt. Damit wurde die sterile Salzlakenlösung kontaminiert, in die Fetakäse eingelegt wurden.

Zielstellung war eine Anfangskonzentration der Salzlake von ca.  $10^6$ /ml *Staphylococcus aureus* (200ml Salzlake auf 200g Käse).

Die Probenahme für den quantitativen Nachweis der kontaminierten Fetakäse auf *Staphylococcus aureus* erfolgte mit Hilfe eines sterilen Spatels, wobei 10g von der vorher abgetropften Käseoberfläche mit einer Tiefe von ca. 2 mm entnommen wurde.

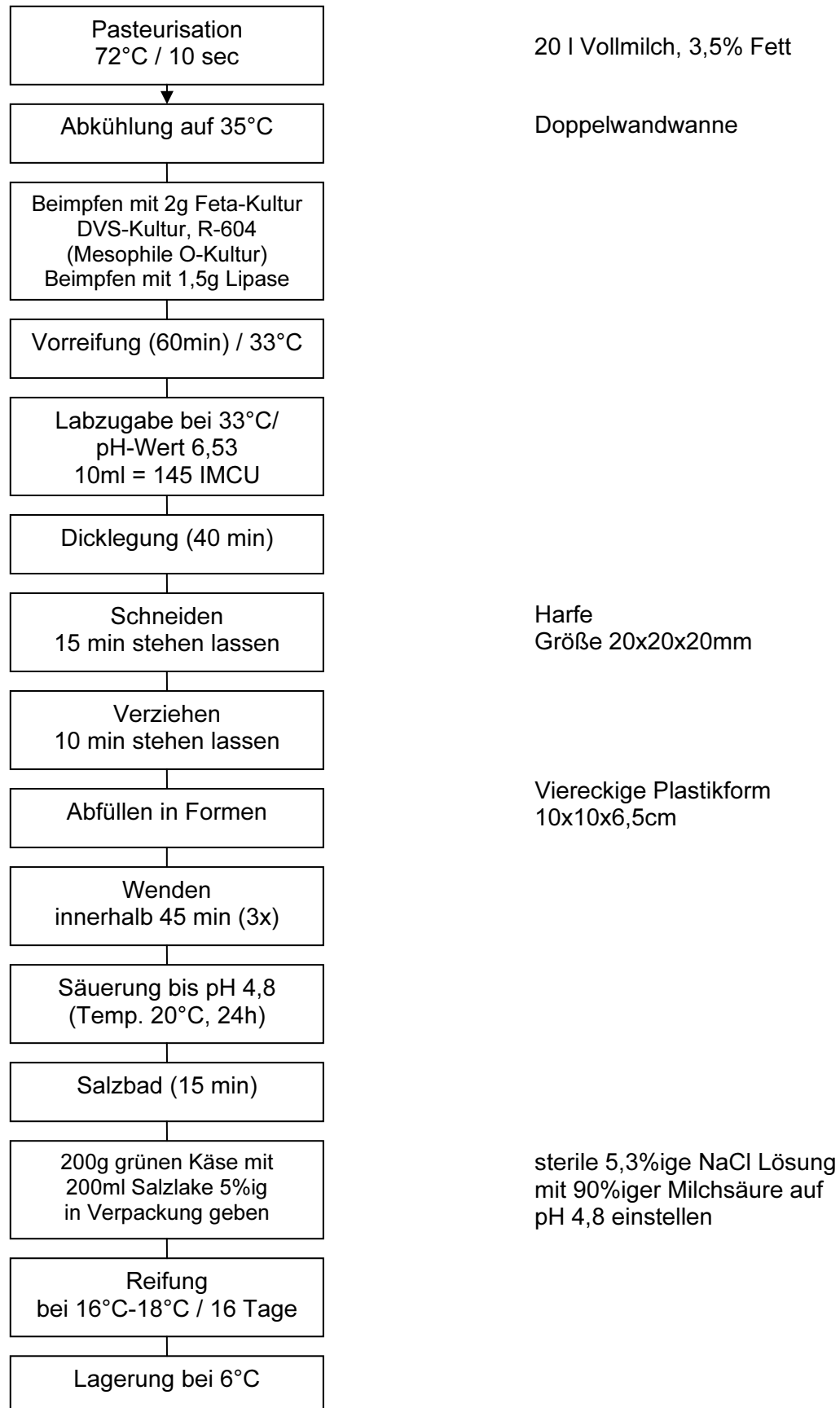


Abb.3: Prozessleitplan zu Herstellung von Fetakäse (Laß, 2003)

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Identifizierung der gefundenen Hefen

Für die sichere Identifizierung wurden neben der Beschreibung morphologischer Merkmale ergänzende Tests zu den physiologischen Eigenschaften über verschiedene Substratverwertungen notwendig (5.5.2 und 5.5.3).

Zur einfachen Bestimmung wurde die Kohlenhydratverwertung biochemisch kontrolliert. Molekularbiologische Untersuchungen wurden zur Absicherung der Identifizierungsergebnisse eingesetzt (5.5.4).

#### 6.1.1 Mikroskopische Darstellung und spezifische Eigenschaften

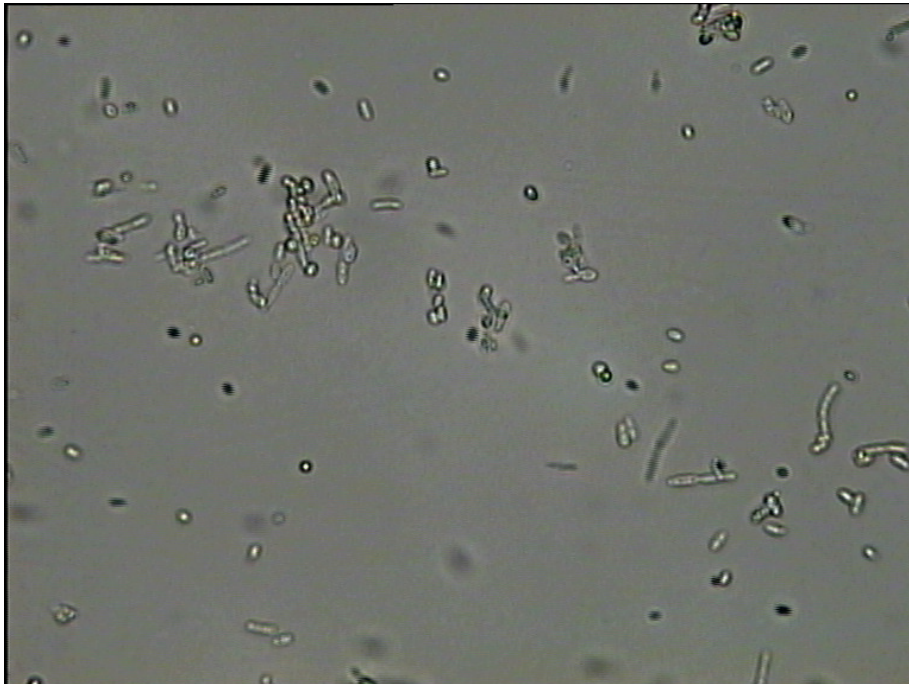


Bild 1: *Candida zeylanoides* (400fach vergrößert)

Beschreibung nach Barnett et al. (1990).

*Candida zeylanoides*:

Weiß bis creme-farbene, buttrige Kolonien, oval, zylindrisch bis längliche Zellen, vermehren sich durch multilaterale Sprossung, geschlechtliche Vermehrung erfolgt nicht.

- Kohlenhydrate werden nicht fermentiert.
- Assimilation von Glucose.
- Nitratverwertung: negativ.
- Nitrit: +/-.

Herkunft: Besiedlung der Haut des Menschen, Erde, Fleisch, Fisch, Wurst, Wasser, Klee.



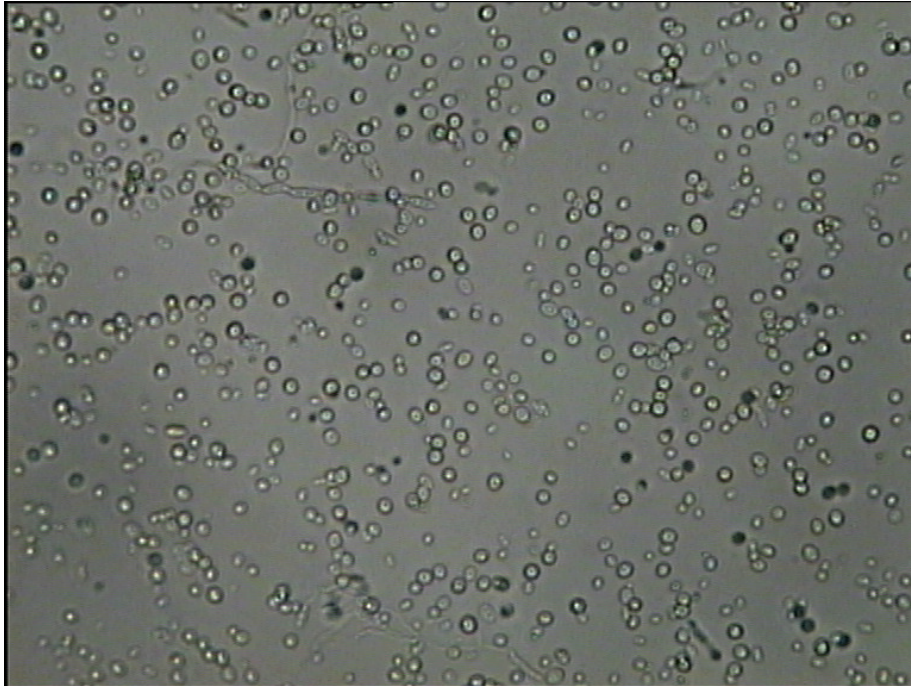


Bild 2: *Candida catenulata* (400fach vergrößert)

Beschreibung nach Barnett et al. (1990).

*Candida catenulata*:

Weiß bis creme-farbene, buttrige Kolonien, oval, zylindrisch bis längliche Zellen, vermehren sich durch multilaterale Sprossung, geschlechtliche Vermehrung erfolgt nicht, Bildung von einfachen bis verzweigten Pseudohyphen.

- Kohlenhydrate werden nicht fermentiert, bis auf Glucose +/-.
- Assimilation von Glucose und Galactose.
- Nitratverwertung: negativ.

Herkunft: Besiedlung der Haut des Menschen, Geflügel, Käse, Milch, Erde, Wasser.

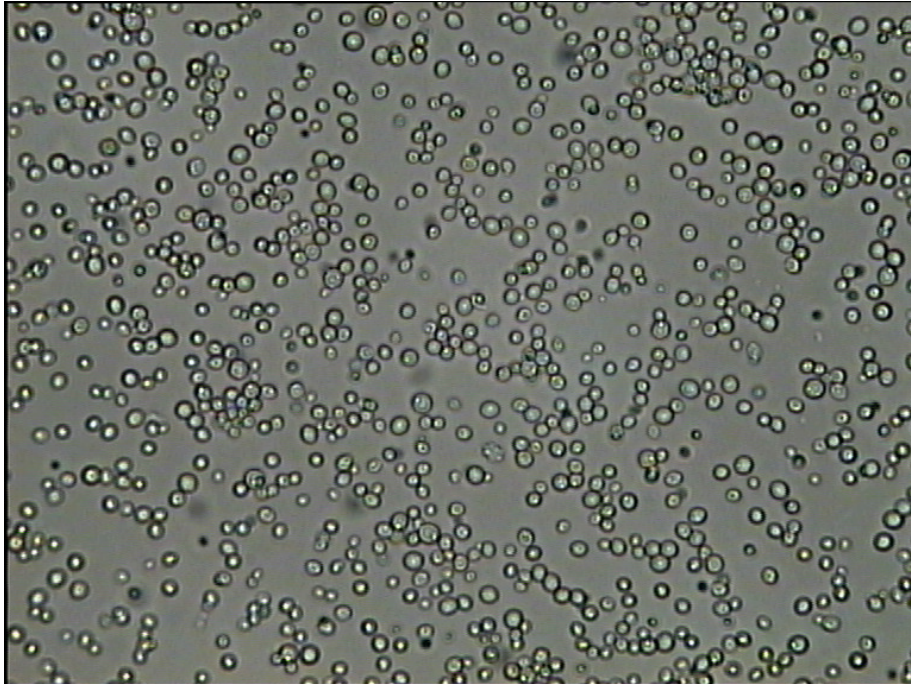


Bild 3: *Candida colliculosa* = ***Torulaspora delbrueckii*** = *Saccharomyces delbrueckii* Lindner var. *delbrueckii* (400fach vergrößert)

Beschreibung nach Barnett et al. (1990).

*Candida colliculosa* (ungeschlechtlicher Zustand):

Weiß bis creme-farbene, buttrige Kolonien, kugelförmige Zellen, ungeschlechtliche Vermehrung durch Sprossung.

- Fermentation von Glucose und Galactose.
- Assimilation von Glucose und Galactose.
- Nitratverwertung: negativ.
- Nitrit: +/-.

Herkunft: Ragi (indonesische Starterhefe, Enzympräparat aus Reis und Schimmelpilzen zur Stärkeverzuckerung), Weintrauben, Traubensaft, Kornbrand aus Hirse, Schafsmilch, Gurkenlauge und in Rinden von Bäumen.

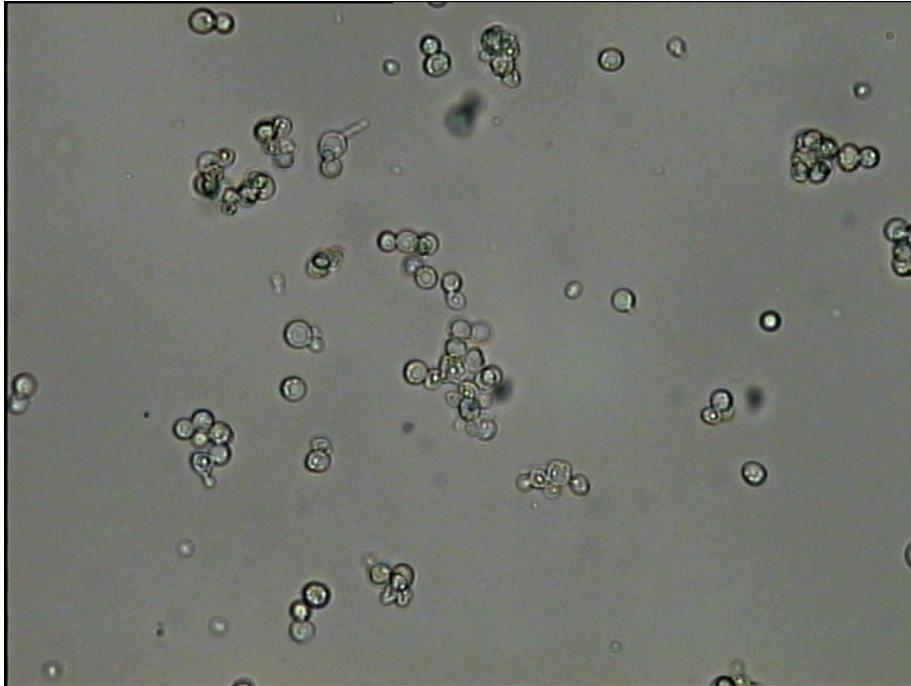


Bild 4: *Candida famata* = ***Debaryomyces hansenii*** (400fach vergrößert)

Beschreibung nach Barnett et al. (1990).

*Candida famata*: (ungeschlechtlicher Zustand)

Weiß bis creme-farbene, buttrige Kolonien, runde bis ovale Zellen, vermehren sich durch multilaterale Sprossung, geschlechtliche Vermehrung erfolgt nicht, Bildung von einfachen Pseudohyphen.

- Kohlenhydrate werden langsam bis schwach oder gar nicht fermentiert, Glucose +/-.
- Assimilation von Glucose und Galactose, Lactose +/-.
- Nitratverwertung: negativ.
- Nitrit: +/-.

Herkunft: Milch, Lab, Käse, Früchte und Beeren, Traubensaft, Wein, Bier, gesalzene Bohnen, Gurkensalzlake, Wurst und Salami, Fleisch, ranzige Butter, gesalzenes Schweinefleisch, Reiswein, Tabak, Sojapaste, Pilze, Luft, Gerbflüssigkeit, Wasser, Besiedelung der Haut des Menschen und Hautbesiedler an Säugetieren.

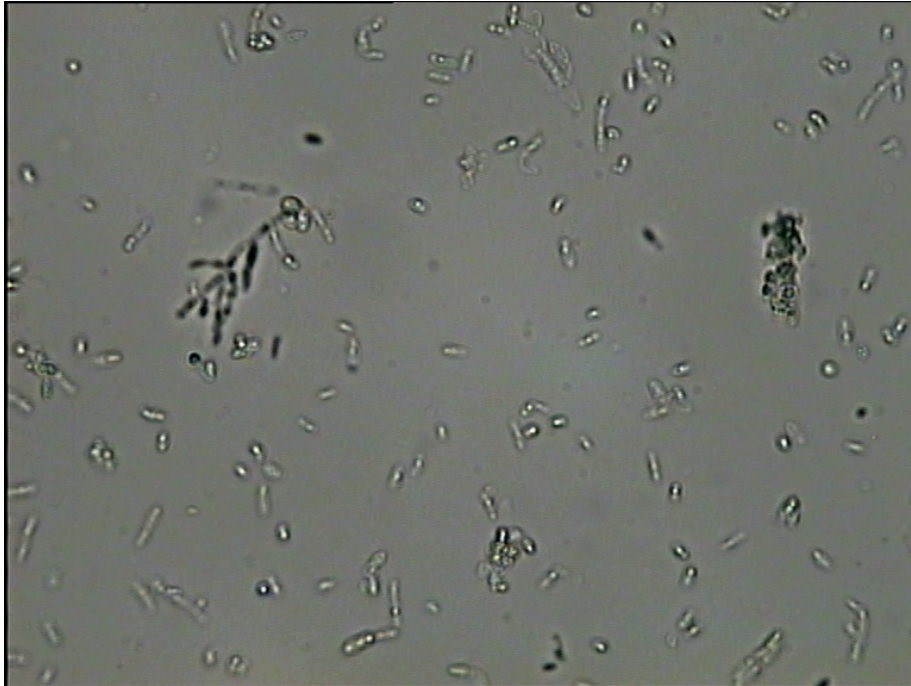


Bild 5: *Candida inconspicua* (400fach vergrößert)

Beschreibung nach Barnett et al. (1990).

*Candida inconspicua*:

Weiß bis creme-farbene, buttrige Kolonien, oval, zylindrisch bis längliche Zellen, vermehren sich durch multilaterale Sprossung, geschlechtliche Vermehrung erfolgt nicht.

- Kohlenhydrate werden nicht fermentiert.
- Assimilation von Glucose.
- Nitratverwertung: negativ.

Herkunft: Besiedlung der Haut des Menschen, Wasser.



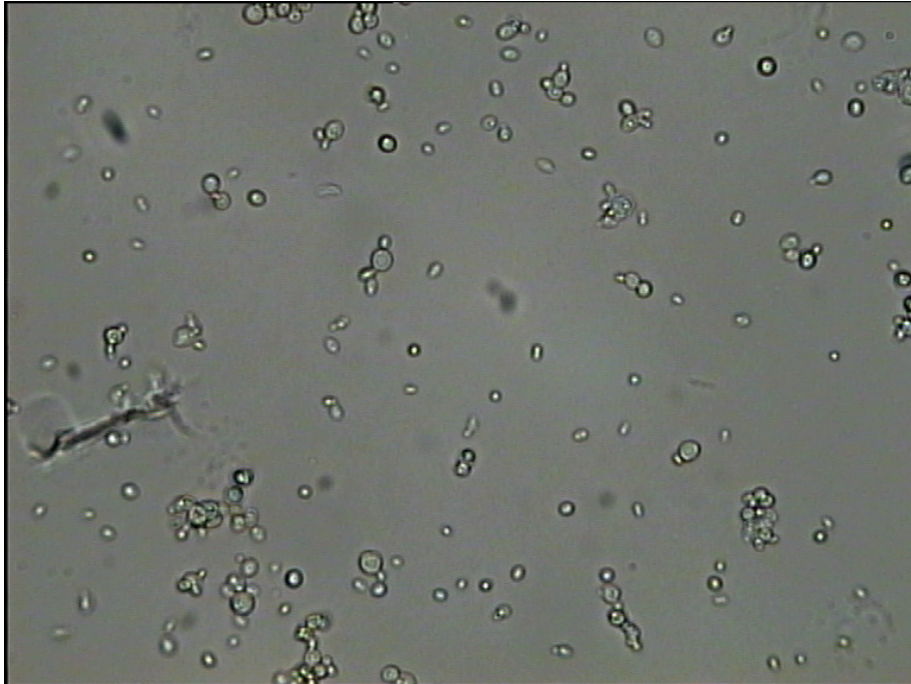


Bild 6: *Candida intermedia* (400fach vergrößert)

Beschreibung nach Barnett et al. (1990).

*Candida intermedia*:

Weiß bis creme-farbene, buttrige Kolonien, oval, zylindrisch bis längliche Zellen, vermehren sich durch multilaterale Sprossung, geschlechtliche Vermehrung erfolgt nicht, Bildung von einfachen bis verzweigten Pseudohyphen.

- Fermentation von Glucose und Galactose.
- Assimilation von Glucose, Galactose und Lactose.
- Nitratverwertung: negativ.

Herkunft: Besiedlung der Haut des Menschen, Erde, Meer, Flaschenbier, Beeren und Trauben.

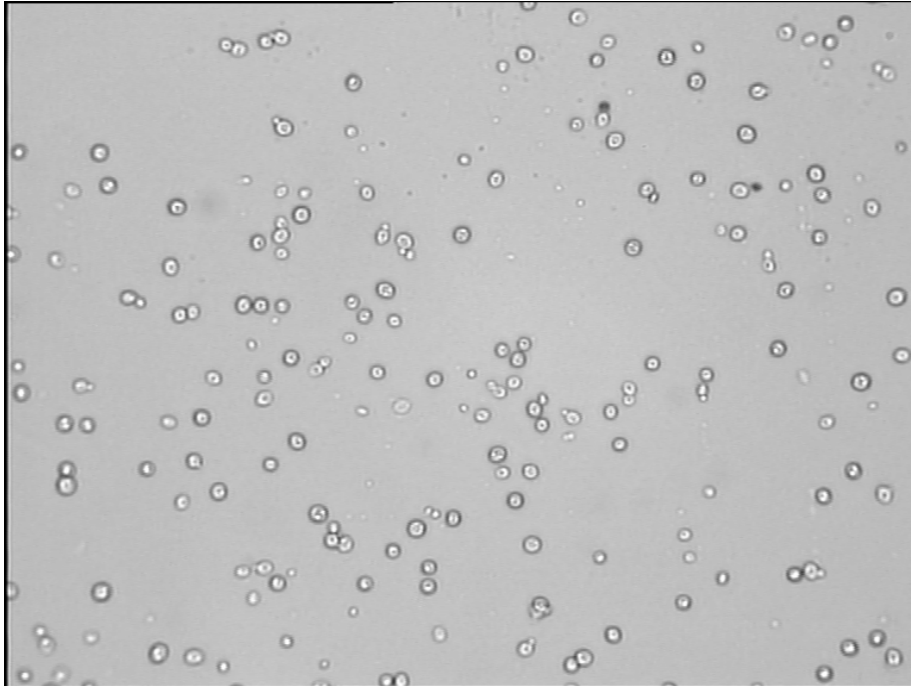


Bild 7: *Candida kefyr* = ***Kluyveromyces marxianus*** var. ***marxianus*** (400fach vergrößert)

Beschreibung nach Barnett et al. (1990).

*Candida kefyr*: (ungeschlechtlicher Zustand)

Weiß, creme- bis pink-farbene, buttrige Kolonien, runde bis ovale Zellen, vermehren sich durch multilaterale Sprossung, Bildung von einfachen Pseudohyphen.

- Fermentation von Glucose , Galactose und Lactose.
- Assimilation von Glucose, Galactose und Lactose.
- Nitratverwertung: negativ.

Herkunft: Milchprodukte, Besiedelung der Haut des Menschen und Hautbesiedler an Säugetieren.

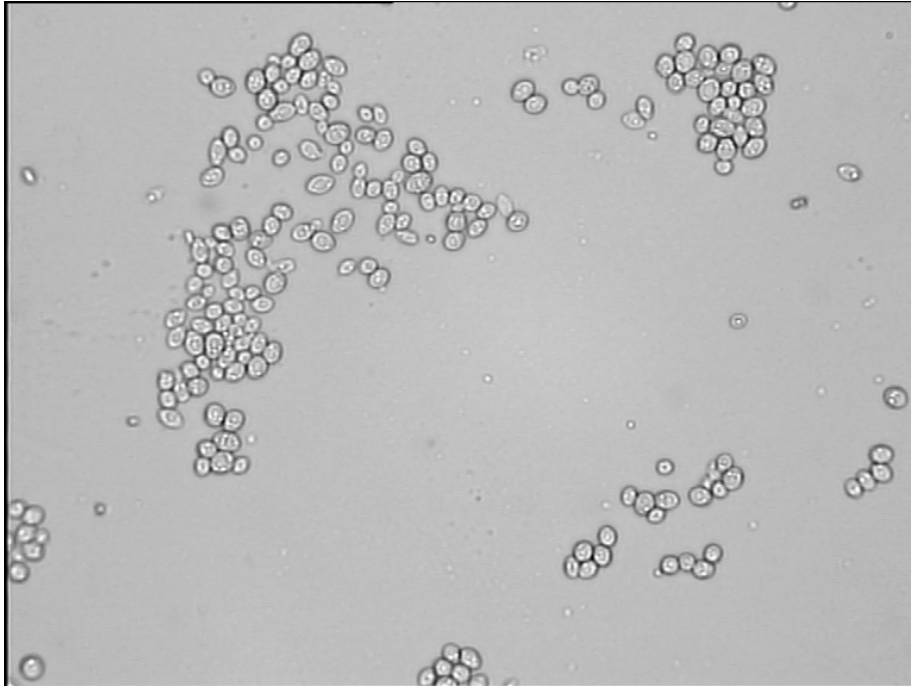


Bild 8: *Candida sphaerica* = (*Kluyveromyces lactis* var. *lactis*) (400fach vergrößert)

Beschreibung nach Barnett et al. (1990).

*Candida sphaerica*: (ungeschlechtlicher Zustand)

Weiß, creme- bis pink-farbene, buttrige Kolonien, runde bis ovale Zellen, vermehren sich durch multilaterale Sprossung, Bildung von einfachen bis verzweigten Pseudohyphen.

- Fermentation von Glucose, Galactose und Lactose.
- Assimilation von Glucose, Galactose und Lactose.
- Nitratverwertung: negativ.

Herkunft: vergorener Quark, Fruchtfliegen, Weinkeller, Besiedelung der Haut des Menschen.

### 6.1.2 Biochemische Methoden ID 32 C

Mit dem API System ID 32 C wurde der Kohlenhydratmetabolismus der isolierten Hefen untersucht. Zur Überprüfung wurden Hefen aus der Stammsammlung mit herangezogen. Die erreichten Identifizierungswahrscheinlichkeiten sind in Tab. 6 aufgelistet.

Bis auf *Candida holmii* (= ***Saccharomyces exiguus***) mit 52,9% Identifizierungswahrscheinlichkeit wurden sehr gute Identifizierungsergebnisse erreicht.

Tab.6: Identifizierungsergebnisse der isolierten Hefe über API ID 32C und ARDRA (Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis)

Stammbez. auf Schräg- Agar	Herkunft und Bezeichnung für Differenzierung	Ergebnisse API ID 32 C	Id in %	Ergebnisse ARDRA
6215 BafM	Stammsammlung BAfM 6215 <i>G. candidum</i>	<i>G. candidum</i>	94,6	<i>Geotrichum candidum</i>
6004 BafM	Stammsammlung BAfM <i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i>	99,9	<i>D. hansenii</i>
H 1	D1a, b -1	<i>Candida colliculosa</i>	99,9	<i>Candida colliculosa</i>
H 2	D1c -2	<i>Candida inconspicua</i>	86,5	
H 3	D2b, c -3	<i>Saccharomyces exiguus</i>	52,9	
H 4	D3a, b, c-4	<i>Candida zeylanoides</i>	99,9	
H 5	D4a, b, c-5	<i>Candida intermedia</i>	98,1	
H 6	D4a, b, c-6	<i>D. hansenii</i>	99,9	<i>D. hansenii</i>
H 7	D4a-7	<i>Candida catenulata</i>	99,6	
H 8	D4b-8	<i>Candida intermedia</i>	72,5	
H 9	D4b -9	<i>D. hansenii</i>	99,9	<i>D. hansenii</i>
H 10	D4c -10	<i>D. hansenii</i>	99,9	<i>D. hansenii</i>
H 11	D2a-11	<i>Candida zeylanoides</i>	94,6	
H 12	D4a-12	<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i>	98,1	<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i>
H 13	D3.a-13	<i>Candida colliculosa</i>	99,9	<i>Candida colliculosa</i>
H 14	D3.b-14	<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i>	98,1	<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i>
H 15	D3.c-15	<i>K. lactis</i> var. <i>lactis</i>	99,9	<i>K. lactis</i> var. <i>lactis</i>

### 6.1.3 Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis (ARDRA) und Gelelektrophorese

Zur Absicherung der über API ID 32 C erzielten Identifizierungsergebnisse wurden Hefen mit ausgezeichneter ID Wahrscheinlichkeit (98-99%) mittels ARDRA differenziert.



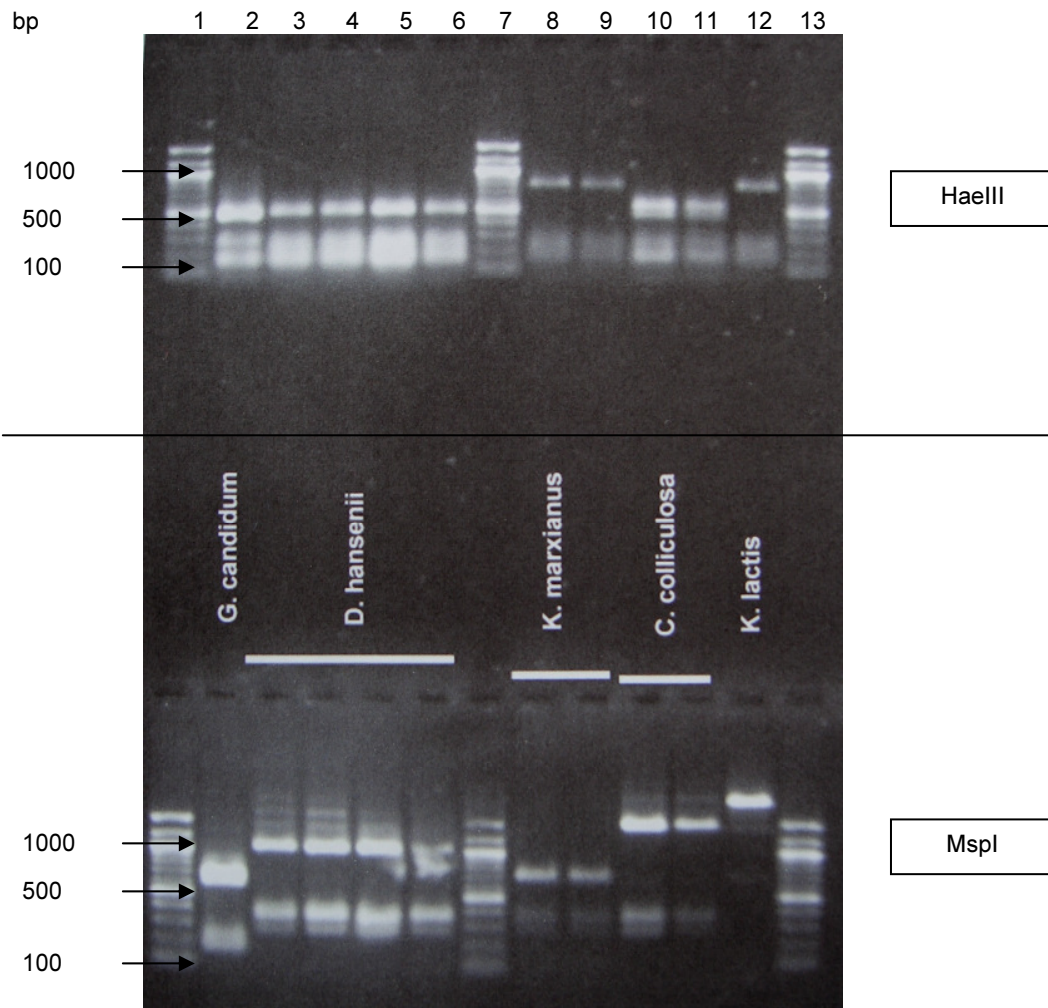


Bild 9: Agarosegel zur Differenzierung von Hefen Spezies mit dem Restriktionsenzym HaeIII oben und dem Restriktionsenzym MspI unten

1: 100bp Leiter, 2: *Geotrichum candidum*/ 6215 BAfM, 3: *D. hansenii*/ 6004 BAfM, 4: *D. hansenii* / H6, 5: *D. hansenii* / H9, 6: *D. hansenii* / H10, 7: 100bp Leiter, 8: *K. marxianus*/ H12, 9: *K. marxianus*/ H14, 10: *C. colliculosa* / H1, 11: *C. colliculosa*/ H13, 12: *K. lactis*/ H15, 13: 100bp Leiter

Die Hefenisolate wurden mit den Restriktionsenzymen HaeIII und MspI verdaut und als PCR Produkte getestet, wobei Anzahl und Größe der Restriktionsfragmente (Restriktionsmuster) für die Identifizierung herangezogen wurden. Mit dem Restriktionsenzym HaeIII konnten die hier getesteten Hefen nicht differenziert werden, da sich die Restriktionsfragmente zu wenig in ihrer Größe unterschieden, und damit Doppel- oder gar Dreifachbanden nicht zu erkennen waren.

Mit MspI konnten *D. hansenii*, (Beladeplätze 3-6) *Geotrichum candidum* (Beladeplatz 2), *K. marxianus* (Beladeplätze 8-9), *C. colliculosa* (Beladeplätze 10-11) und *K. lactis* (Beladeplatz 12) sicher identifiziert werden. Als Referenz wurden auf Beladeplatz 3 aus der Stammsammlung 6004 BafM *D. hansenii* und auf Beladeplatz 2 aus der Stammsammlung 6215 *Geotrichum candidum* mitgeführt (Bild 9).

## 6.2 Identifizierung der gefundenen Staphylokokken

### 6.2.1 Biochemische Methoden ID 32 STAPH

Mit diesem System wurden 26 verschiedene Substrate (Kohlenhydrate, Enzyme etc.) überprüft. Anhand der Reaktionen und der sich daraus ergebenden numerischen Codierung konnte über die dazugehörige Software die Identifizierungswahrscheinlichkeit (Id) angegeben werden (5.5.3.2).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgelistet. Dabei konnte *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis* und *Staphylococcus warneri* mit einer Id von 99% identifiziert werden.

Aus der Reihe fiel das Ergebnis *S. epidermidis* mit einer ID von 76,8 %. Das API System gab *S. epidermidis* als Taxon der ersten Wahl mit 76,8% und als nächstes Taxon *S. warneri* mit 2,8 % an.

*S. warneri* wurde als Kontrollstamm aus der Stammsammlung mitgeführt, die Überprüfung über ID 32 STAPH ergab ein sehr gutes Identifizierungsergebnis mit 99,1%.

Tab.7: Identifizierungsergebnisse der isolierten Staphylokokken über API ID 32STAPH und ARDRA (Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis)

Stammbez. auf Kryo- röhrchen	Herkunft und Bezeichnung für Differenzierung API	Ergebnisse API ID 32 STAPH	Id in %	Ergebnisse ARDRA
S 1	D4a-186 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,1	<i>S. aureus</i>
S 2	D4b-186 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,9	<i>S. aureus</i>
S 3	D4c-186 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,9	<i>S. aureus</i>
S 4	D4a-177 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,9	<i>S. aureus</i>
S 5	D4b-177 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,9	<i>S. aureus</i>
S 6	D2a-133 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,9	<i>S. aureus</i>
S 7	D2b-133 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,9	<i>S. aureus</i>
S 8	D2c-133 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,9	<i>S. aureus</i>
S 9	D3b-60 d vor MHD	<i>S. aureus</i>	99,9	<i>S. aureus</i>
S 11	D4a- MHD 6 Monate	<i>S. hominis</i>	99,7	<i>S. hominis</i>
S 12	D4b-MHD 6 Monate	<b><i>S. epidermidis</i></b> (Taxon 2. Wahl: <i>S. warneri</i> )	<b>76,8</b> 2,8%)	<b><i>S. warneri</i></b>
AD16/P1168	Stammsammlung Kiel <i>Staph. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	99,1	<i>S. warneri</i>

### 6.2.2 Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis (ARDRA) und Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der über API erzielten Identifizierungswahrscheinlichkeiten wurden alle isolierten Staphylokokken und *S. warneri* als Kontrollstamm über ARDRA getestet.

Alle *Staphylococcus*-Isolate konnten durch Verdau des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym HindIII speziesspezifisch identifiziert werden.

Wie Bild 10 zu entnehmen ist, schnitt das Restriktionsenzym HindIII die PCR Produkte der Stämme S1, S3, S4 und S9 (Beladeplätze 2 bis 5) in identische Fragmente für *Staphylococcus aureus*.

Bei S12 und AD16/P1168 (Beladeplätze 7 und 8) handelt es sich um typische Fragmente für *Staphylococcus warneri*. In der gleichen Gruppierung befindet sich Stamm S11 (Beladeplatz 6) wobei die zweitgrößte Bande bei 700 bp liegt, spezifisch für *Staphylococcus hominis*.

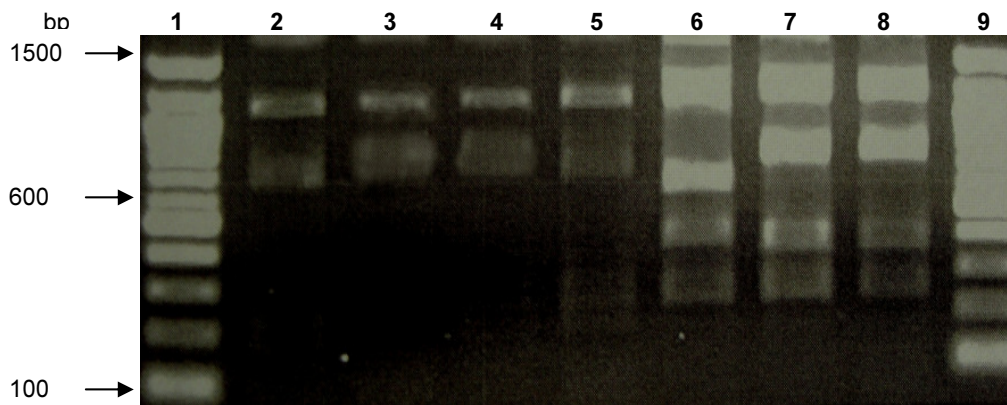


Bild 10: Agarosegel zur Differenzierung von *Staphylococcus* Subspezies mit dem Restriktionsenzym HindIII

1: 100bp Leiter, 2: *S. aureus*/ S1, 3: *S. aureus*/ S3, 4: *S. aureus*/ S4, 5: *S. aureus*/ S9, 6: *S. hominis*/ S11, 7: *S. warneri*/ S12, 8: *S. warneri*/ AD16/P1168, 9: 100bp Leiter

Über ARDRA bestätigten sich die über API erzielten Id von 99% bei *S. aureus*, *S. warneri* und *S. hominis*.

Stamm S12 mit API als *S. epidermidis* mit 76,8% Id und als Taxon 2. Wahl mit 2,8% *S. warneri* getestet, wurde über ARDRA als *S. warneri* (Beladeplatz 7) getestet, im Vergleich zum Referenzstamm AD16/P1168 *S. warneri* (Beladeplatz 8) mit identischen Fragmenten.

### 6.3 Ergebnisse im Lagertest bei unterschiedlichen Lagertemperaturen

Die Untersuchungen auf pH-Wert, Salzgehalt, Hefen und Staphylokokken wurden immer aus einer Verpackungseinheit je Lagertemperatur durchgeführt, was bedeutete, dass innerhalb der Untersuchungszeiträume stets eine neue Verpackungseinheit verwendet wurde. Schon geöffnete Fetakäse neigten zur Schimmelpilzbildung, so dass angebrochene Verpackungen nach Untersuchungs-ende verworfen wurden. Es konnten daher über den Lagerzeitraum nicht kontinuierlich Proben aus ein und demselben Fetakäse gezogen werden, sondern die Untersuchungsergebnisse stehen für eine Verpackungseinheit am dargestellten Probenahmetag.

#### 6.3.1 Versuchsreihe D1 (Bulgarischer Fetakäse)

##### 6.3.1.1 Charakterisierung über pH-Wert, Salzgehalt, Hefen- und Staphylokokkenentwicklung

###### Hefenentwicklung

Bei dem Bulgarischen Fetakäse wurde vom Hersteller eine Mindesthaltbarkeit von 7 Monaten deklariert.

Der Salzgehalt- und pH-Verlauf zeigte über den Untersuchungszeitraum trotz der extremen Lagerbedingungen zwischen 6 und 25°C keine größeren Schwankungen.

Die Anzahl der Hefen schwankte zwischen  $10^4$  und maximal bis  $10^6$ /g Käse.

Bis zum MHD wurde bei 6°C ein Mittelwert von  $2,5 \cdot 10^4$ , bei 15°C ein Mittelwert von  $1,7 \cdot 10^5$  und bei 25°C ein Mittelwert von  $4,3 \cdot 10^5$  Hefen/g erreicht.

Dabei handelte es sich bei D1a (Lagertemperatur 6°C) und D1b (Lagertemperatur 15°C) ausschließlich um *Candida colliculosa*, bei D1c (Lagertemperatur 25°C) jedoch um eine Mischung aus *Candida colliculosa* und *Candida inconspicua*.

Bei 25°C Lagertemperatur, 1 Monat nach MHD, bricht die Hefenpopulation zusammen, im Gegensatz zu den Lagerbedingungen bei 6 und 15°C.

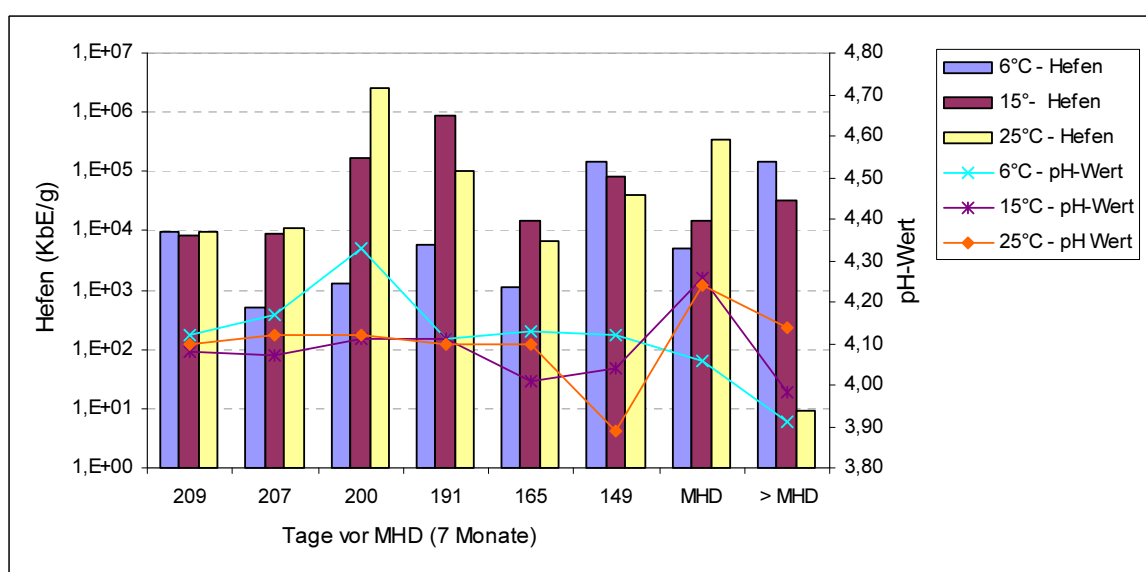


Abb.4: Bulgarischer Fetakäse, Hefen- und pH-Wert-Entwicklung



Über den gesamten Zeitraum waren innerhalb der Nachweisgrenze keine Staphylokokken nachweisbar.

[illegible]

### 6.3.1.2 Sensorische Bewertung

Die Fetakäse wurden einer sensorische Prüfung, gemäß der bewertenden Prüfung mit Skale, dem 5 Punkte Prüfschema (5.4.3) unterzogen.

Wenn weniger als 4 Punkte vergeben wurden, mussten bei allen Kriterien die Fehler benannt und notiert werden. Daraus ergaben sich die Angaben in den folgenden Abbildungen.

#### **Bulgarischer Fetakäse (D1)**

Sensorische Qualitätsbewertung (Abb.6) in Abhängigkeit der Lagertemperatur und der isolierten Hefen:

##### 25°C Lagertemperatur:

In der Sensorik, machte sich bei 25°C Lagertemperatur der Anstieg der Hefen besonders im Geruch und Geschmack schon 200 Tage vor MHD bemerkbar. Hier korreliert der Anstieg der Hefen mit den sensorischen Fehlern „gärig“, „hefig“, „sauer“ und „bitter“ bis „ranzig“.

Die Konsistenz und das Aussehen im Äußeren wurden erst am MHD bei 25°C bemängelt.

Isolierte Hefen:

*Candida colliculosa* (Bild 3) und *Candida inconspicua* (Bild 5).

Nach der Beschreibung von Barnett et al. (1990) ist *C. colliculosa* zur Fermentation von Glucose und Galactose fähig und wurde aus Schafsmilch isoliert. *C. inconspicua* kann Kohlenhydrate nicht fermentieren, die Herkunft ist Hautbesiedler des Menschen und Wasser.

Die Fehler „bitter“ bis „ranzig“ sind demzufolge auf die Bildung von intensiv fett- und eiweißabbauenden Enzymen zurückzuführen (Bintsis et al. 2003; Riemelt et al. 2003).

##### 15°C Lagertemperatur:

Bei 15°C Lagertemperatur wurden erst am MHD geschmackliche Fehler wie „sauer“ und „ranzig“ angesprochen.

15°C Lagertemperatur bewirkte am MHD im „Aussehen Äußeres“ den Fehler „schwammig“ und 1 Monat nach MHD im Kriterium „Aussehen Inneres“ den Fehler „Molkennester“.

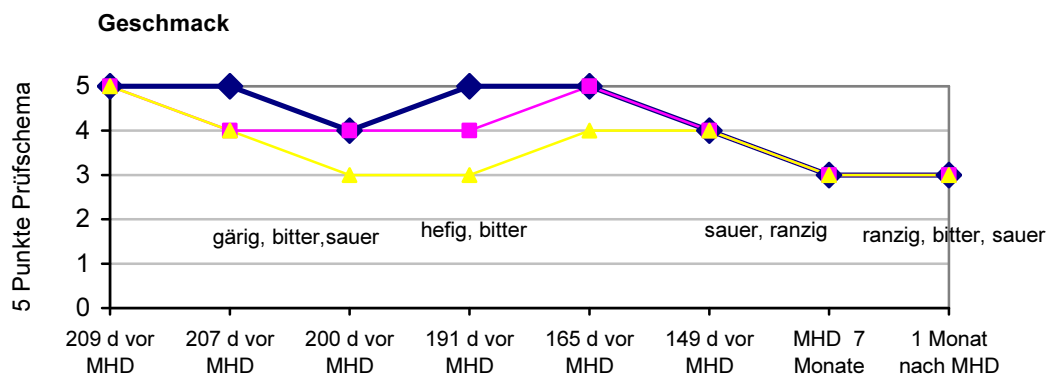
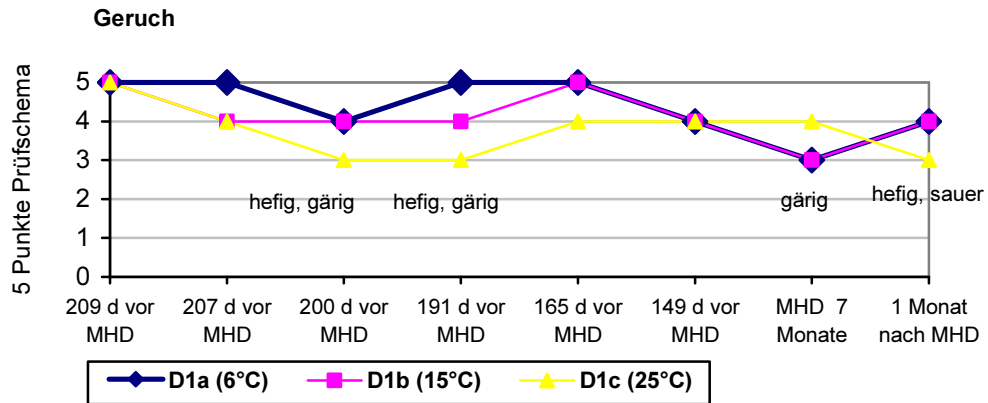
##### 6°C Lagertemperatur:

Auch hier wurden erst am MHD geschmackliche Fehler wie „sauer“ und „ranzig“ angesprochen.

Bei 6°C gab es über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Mängel in der Konsistenz und dem Aussehen.

Bei 15°C und 6°C konnte nur *C. colliculosa* nachgewiesen werden. Da *C. colliculosa* nach Barnett et al. (1990) auch aus Schafsmilch isoliert wurde, sind kaum sensorische Fehler im Fetakäse aufgetreten.

Die zum MHD angesprochenen Defekte wie „ranzig“, „schwammig“ und „Molkennester“ können der artspezifischen Hydrolyse des MilCHFettes durch *C. colliculosa* zugeschrieben werden (Pereira-Dias et al. 2000).



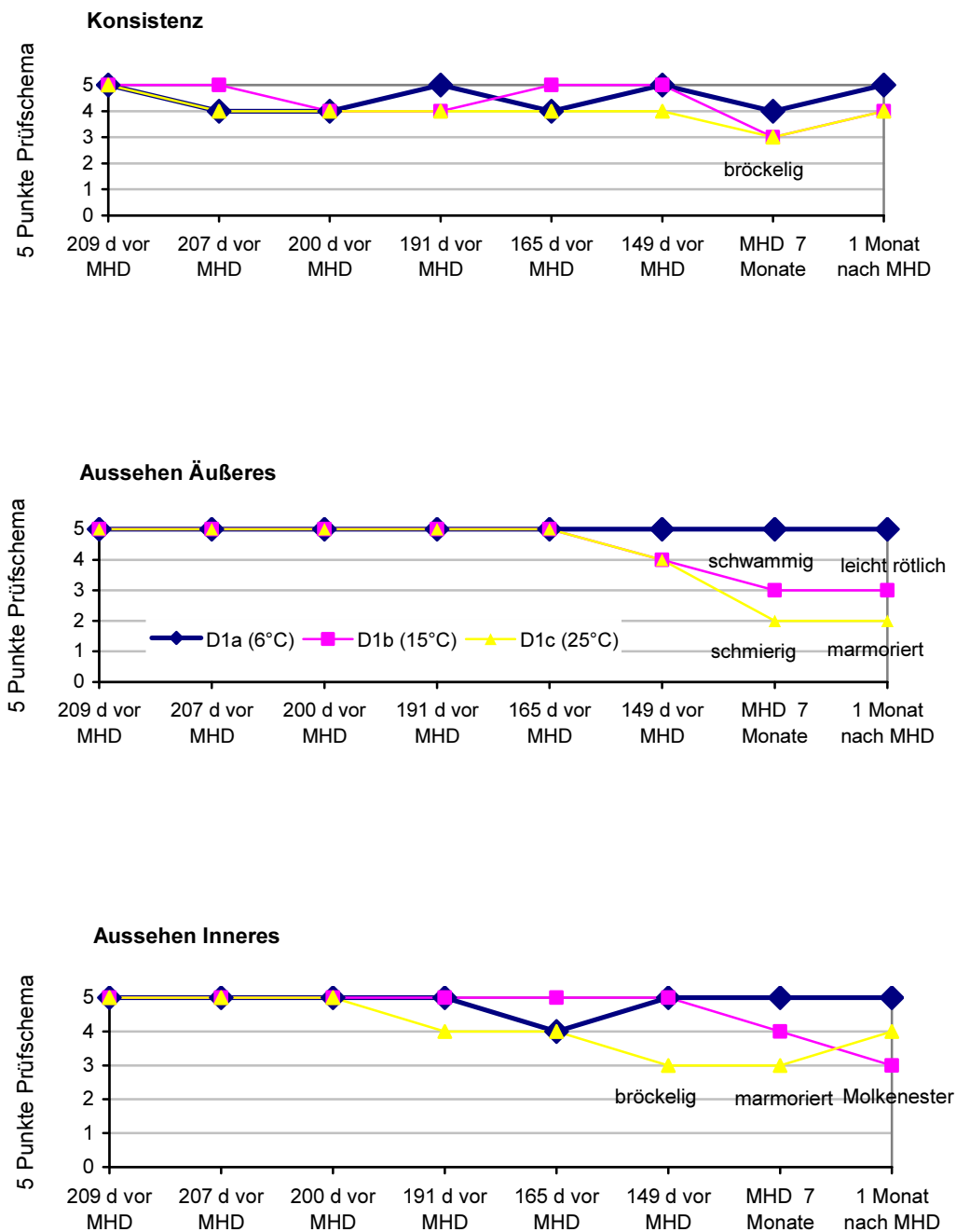


Abb.6: Sensorische Beurteilung des Bulgarischen Fetakäse im Lagertest bei 6°C, 15°C und 25°C Lagertemperatur



### 6.3.2 Versuchsreihe D2 (Griechischer Fetakäse)

#### 6.3.2.1 Charakterisierung über pH-Wert, Salzgehalt, Hefen- und Staphylokokkenentwicklung

##### Hefenentwicklung

Der Hersteller garantierte bei diesem Fetakäse eine Mindesthaltbarkeitsdauer von 5 Monaten.

*Candida holmii* (= *Saccharomyces exiguus*) und *Candida zeylanoides* wurden bei 6°C (D2a) in diesem Lagertest nachgewiesen. Bei 15°C (D2b) und 25°C (D2c) wurde nur noch *S. exiguus* identifiziert.

DAVENPORT (1998) listet *S. exiguus* als verderbniserregende Hefe bei Getränken auf, verursacht durch Prozessfehler wie Zugabe oder Weglassen von Konservierungsmitteln z.B. Sorbinsäure, Hygienemängel und oder ungenügende Pasteurisationstemperaturen.

Bei 15 und 25°C begann der pH-Wert anzusteigen und damit war bei 25°C eine deutliche Reduzierung der Hefen vor Erreichen des MHD zu verzeichnen. Bei Lagertemperaturen von 6°C pegelte sich der Hefenbestand auf  $10^5$  KbE/g ein.

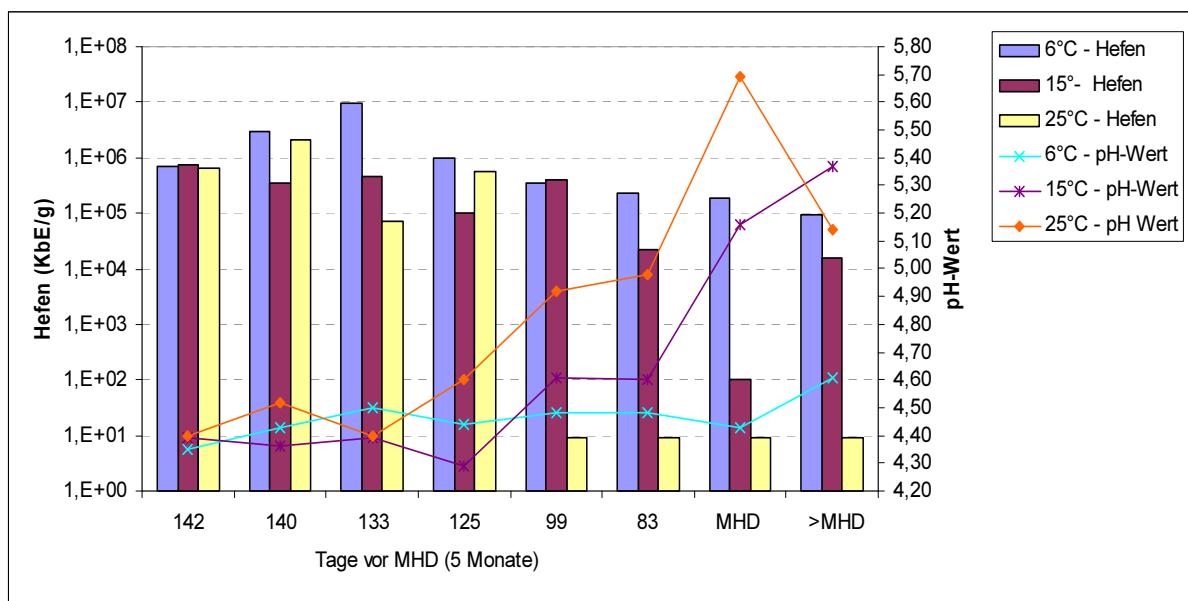


Abb.7: Griechischer Fetakäse, Hefen- und pH-Wert-Entwicklung

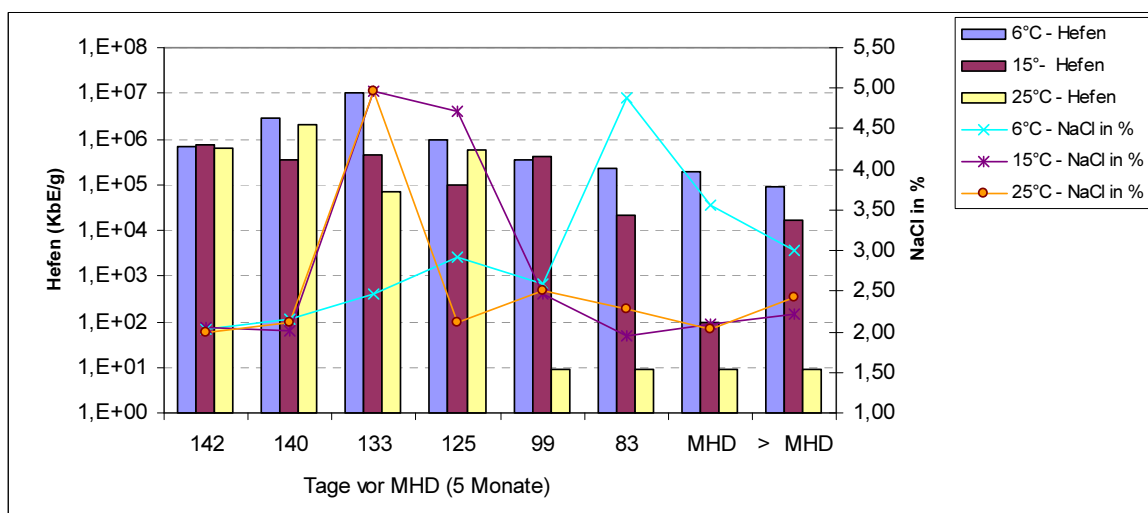


Abb.8: Griechischer Fetakäse, Hefenentwicklung und Salzgehaltsverlauf

### Staphylokokkenentwicklung

Bei diesem Lagertest waren Staphylokokken, bis auf eine Ausnahme 133 d vor MHD, nicht nachweisbar.

Die Identifizierung über API und ARDRA ergaben *Staphylococcus aureus*.

Max. 70 *Staphylococcus aureus*/g haben jedoch keine qualitätsmindernde oder gesundheitsgefährdende Relevanz im Produkt.

Tab.9: Staphylokokkenentwicklung (KbE/g) im Lagertest bei 6°C, 15°C und 25°C

	142 d vor MHD	140 d vor MHD	133 d vor MHD	125 d vor MHD	99 d vor MHD	83 d vor MHD	MHD 5 Monate	1 Monat nach MHD
D2a	<10	10	10	<10	<10	<10	<10	<10
D2b	<10	<10	70	<10	<10	<10	<10	<10
D2c	<10	<10	56	<10	<10	<10	<10	<10

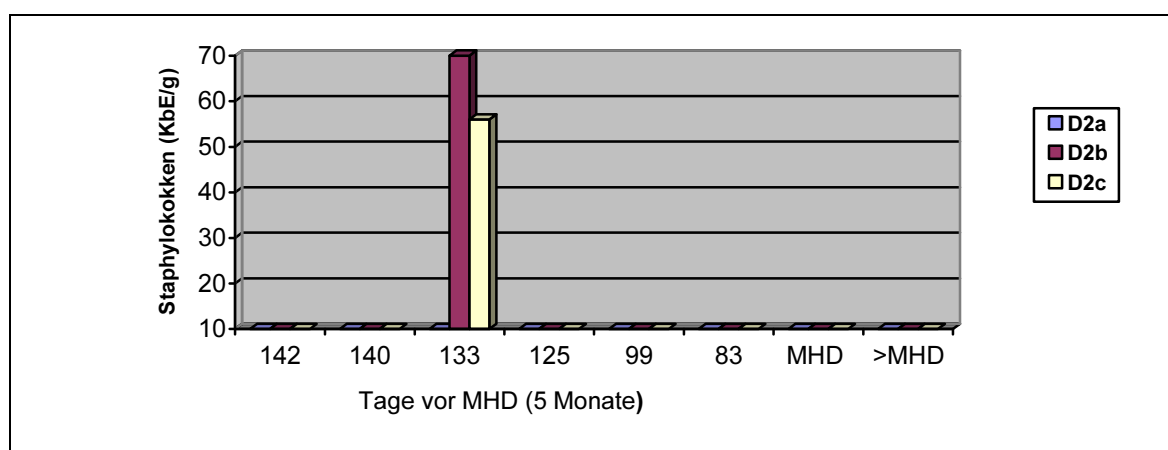


Abb.9: Nachweis von *Staphylococcus aureus* im Lagertest

### 6.3.2.2 Sensorische Bewertung

#### Griechischer Fetakäse (D2)

Sensorische Qualitätsbewertung (Abb.10) in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und den isolierten Hefen:

##### 25°C Lagertemperatur:

Innerhalb der 5 Monate vor MHD waren bei 25°C Lagertemperatur sehr zeitig im Geschmack und Geruch Abwertungen zu verzeichnen. Die Geschmacksfehler „sauer“, „leicht gärig“ bis „bitter“ und „seifig“ wurden schon 140 Tage vor MHD angesprochen (Abb. 10).

Isolierte Hefe:

*Candida holmii* (= *Saccharomyces exiguus*).

Nach Davenport (1982) wird *S. exiguus* als verderbniserregende Hefe bei Getränken beschrieben. Barnett et al. (1990) beschreiben die Fähigkeit zur Fermentation und Assimilation von Glucose und Galactose.

Ab 99 Tage vor MHD stieg der pH-Wert, zugleich waren keine Hefen mehr im auswertbaren Bereich nachweisbar. Die Fehler in der Konsistenz „schwammig“, „weich“ und im Geschmack „bitter“ und „seifig“ deuten daraufhin, dass die Stoffwechselprodukte der gesamten Mikroflora den Verderb ausmachen, da Hefen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar waren.

##### 15°C Lagertemperatur:

Erst am MHD war die Probe im Geschmack verdorben. 85 Tage vor MHD traten jedoch bereits im Geruch die Fehler „gärig“ und „hefig“ auf.

Die Konsistenz, Aussehen Äußeres und Aussehen Inneres wurden hier erst 1 Monat nach MHD abgewertet, da zu diesem Zeitpunkt die Proben verdorben und nicht mehr sensorisch verwertbar waren.

Isolierte Hefe: *Candida holmii* (= *Saccharomyces exiguus*).

##### 6°C Lagertemperatur:

Diese Lagertemperatur garantiert, auch bei Hefepopulationen zwischen  $10^6$  und  $10^5$ /g Käse, bis zum MHD keine sensorischen Fehler (in allen Kriterien) die zu Bewertungen unter 4 Punkten führen.

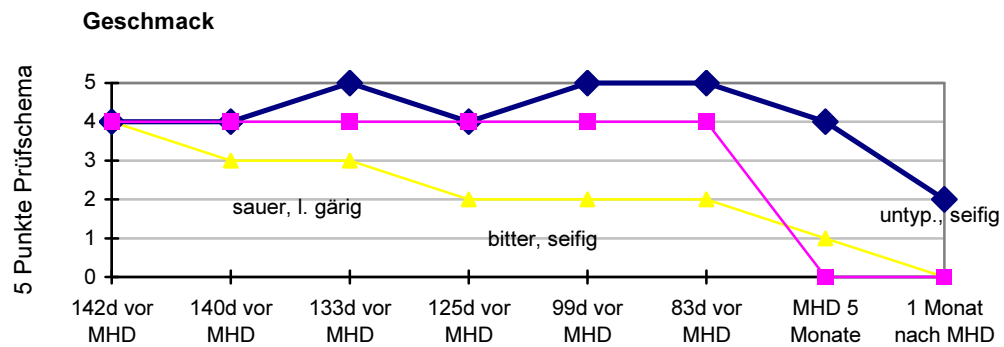
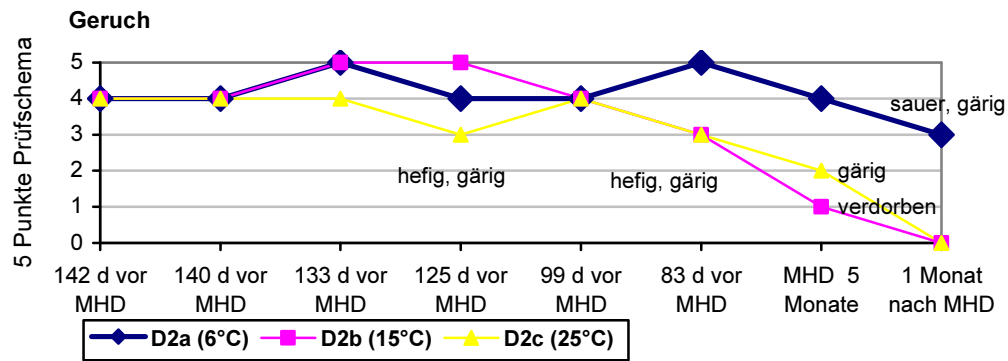
1 Monat nach MHD wurden im Geschmack die Fehler „untypisch“, „seifig“ und in der Konsistenz die Fehler „klebrig“ und „bröckelig“ bemängelt.

Isolierte Hefen:

*Candida holmii* (= *Saccharomyces exiguus*) und *Candida zeylanoides*.

*C. zeylanoides* (Bild 1) kann Kohlenhydrate nicht fermentieren. Glucose kann assimiliert werden.

Auch hier sind die Fehler „untypisch“, „seifig“, „klebrig“ auf die Bildung von intensiv fett- und eiweißabbauenden Enzymen zurückzuführen (Bintsis et al. 2003; Riemelt et al. 2003).



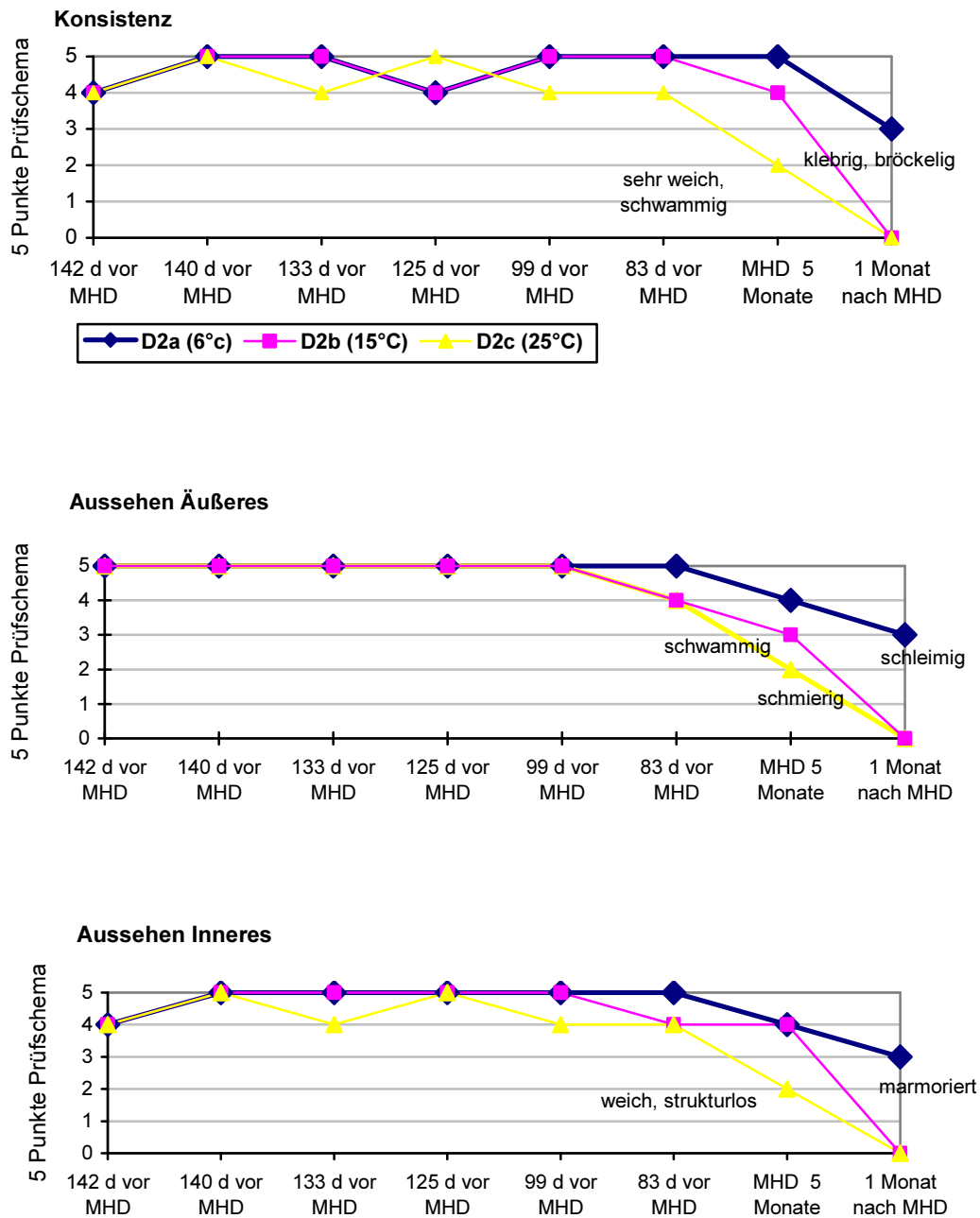


Abb.10: Sensorische Beurteilung des Griechischen Fetakäses im Lagertest bei 6°C, 15°C und 25°C Lagertemperatur

### 6.3.3 Versuchsreihe D3 (Französischer Fetakäse)

#### 6.3.3.1 Charakterisierung über pH-Wert, Salzgehalt, Hefen- und Staphylokokkenentwicklung

##### Hefenentwicklung

Der Hersteller garantierte bei diesen Fetakäsen 3 Monate Mindesthaltbarkeit. Der Salzgehalt lag zwischen 2,7 und 3,2%. Die pH-Werte blieben über den gesamten Zeitraum bei 6°C und 25°C stabil und lagen zwischen 4,3 und 4,5.

Die Hefenpopulationen/g wurden bis zum MHD mit im Mittelwert  $1,4E+06$  bei 6°C Lagertemperatur,  $3,4E+05$  bei 15°C Lagertemperatur und  $4,0E+05$  bei 25°C Lagertemperatur bestimmt.

Bei diesem Lagertest konnten bei den entsprechenden Lagerungstemperaturen folgende Hefen identifiziert werden:

Bei Lagertemperaturen von 6°C (D3a) wurden *Candida colliculosa*, bei 15°C (D3b) *Candida kefyr* (= *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*) und bei 25°C (D3c) *Candida sphaerica* (= *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*) nachgewiesen.

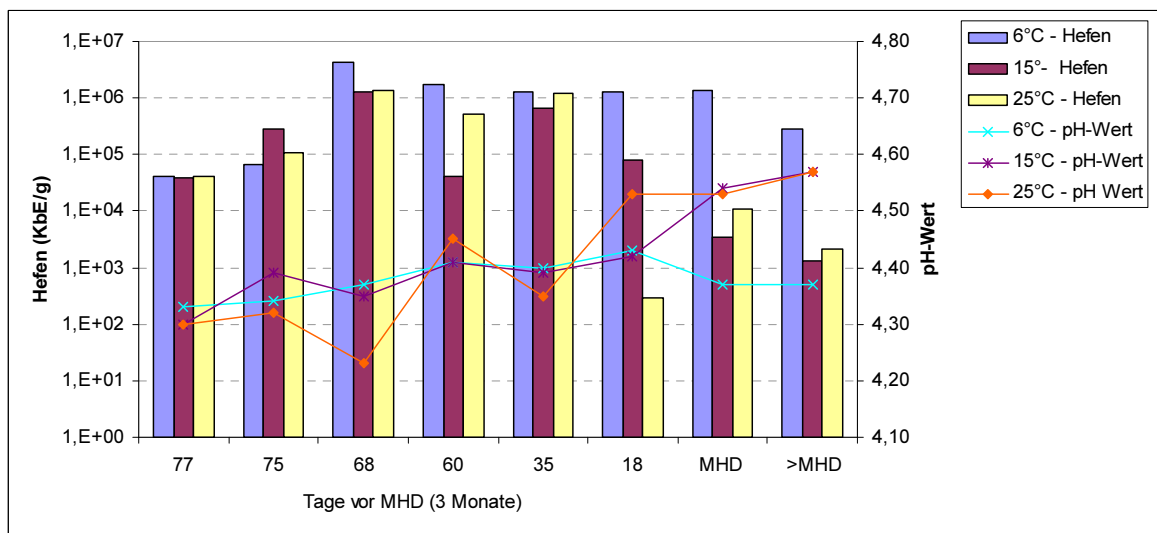


Abb.11: Französischer Fetakäse, Hefen- und pH-Wert-Entwicklung



Staphylokokken waren  $<10$  KbE/g. Nur 60 Tage vor MHD wurden einmalig bei  $15^{\circ}\text{C}$  Lagertemperatur 3990 *Staphylococcus aureus*/g identifiziert.

[illegible]

### 6.3.3.2 Sensorische Bewertung

#### Französischer Fetakäse (D3)

Sensorische Qualitätsbewertung (Abb.13) in Abhängigkeit der Lagertemperatur und der isolierten Hefen:

##### 25°C Lagertemperatur:

75 Tage vor MHD wurden im Geschmack die Fehler „gärig“ und „hefig“, 60 und 35 Tage vor MHD „bitter“ und „gärig“ und zum MHD und 1 Monat nach MHD „sauer“ und „leicht ranzig“ angesprochen.

Das „Aussehen Äußeres“ „rötlich“, „schmierig“ und das „Aussehen Inneres“ „rötlich“ und „ausgefettet“ wurden erst am MHD fehlerhaft bewertet.

Isolierte Hefe:

*Candida sphaerica* (= *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*), (Bild 8).

Diese Hefe ist in der Lage Glucose, Galactose und Lactose zu fermentieren und zu assimilieren. Weiß, creme bis pinkes Aussehen wird ihr zugeschrieben (Barnett et al. 1990). *K. lactis* var. *lactis* wird eine hohe proteolytische Aktivität zugeschrieben (Grieve et al. 1983).

##### 15°C Lagertemperatur:

Vor MHD war der Fetakäse in allen Kriterien ohne deutliche Fehler. Am MHD wurde das „Aussehen Inneres“ mit den Fehlern „bröckelig“ und „ausgefettet“, der Geschmack mit „sauer“, „leicht ranzig“ und die Konsistenz „bröckelig“ und „griesig“ bewertet.

Isolierte Hefe: *Candida kefyr* (= *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*), (Bild 7).

Der Verderb von Milchprodukten wird auch durch andere physiologische Eigenschaften wie Fermentation und Assimilation von Lactose (*K. marxianus* var. *marxianus*) und durch Assimilation von Milchsäure (*D. hansenii*, *K. marxianus* var. *marxianus*) und Hydrolyse von Casein (*D. hansenii*, *K. marxianus* var. *marxianus*) hervorgerufen (Boekhout et al. 2003).

Nach Bintsis et al. (2000) stellt die Salzlake eine Hauptkontaminationsquelle für verschiedene Hefearten dar, wie z.B. *K. marxianus* var. *marxianus*.

*K. lactis* var. *lactis* und *K. marxianus* var. *marxianus* wird eine hohe proteolytische Aktivität zugeschrieben (Grieve et al. 1983).

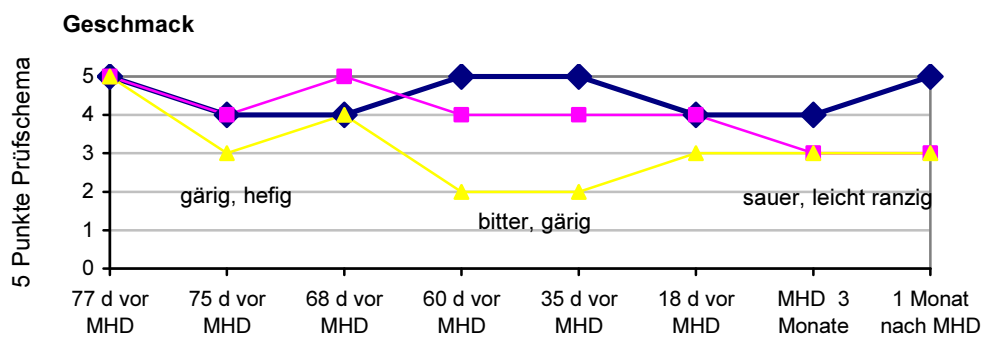
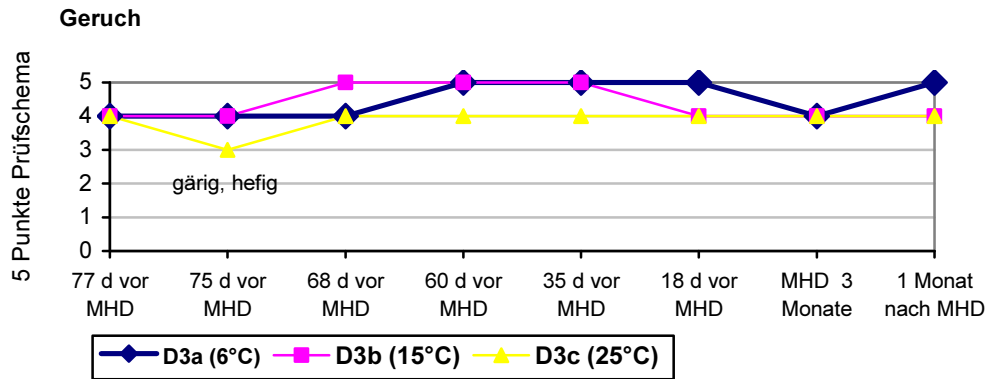
##### 6°C Lagertemperatur:

Über den gesamten Zeitraum und 1 Monat nach MHD wurden in allen Kriterien keine Fehler angemerkt.

Isolierte Hefe: *Candida colliculosa*

Da *C. colliculosa* nach Barnett et al. (1990) auch aus Schafsmilch isoliert wurde, sind hier bei 6°C keine sensorischen Fehler im Fetakäse aufgetreten.





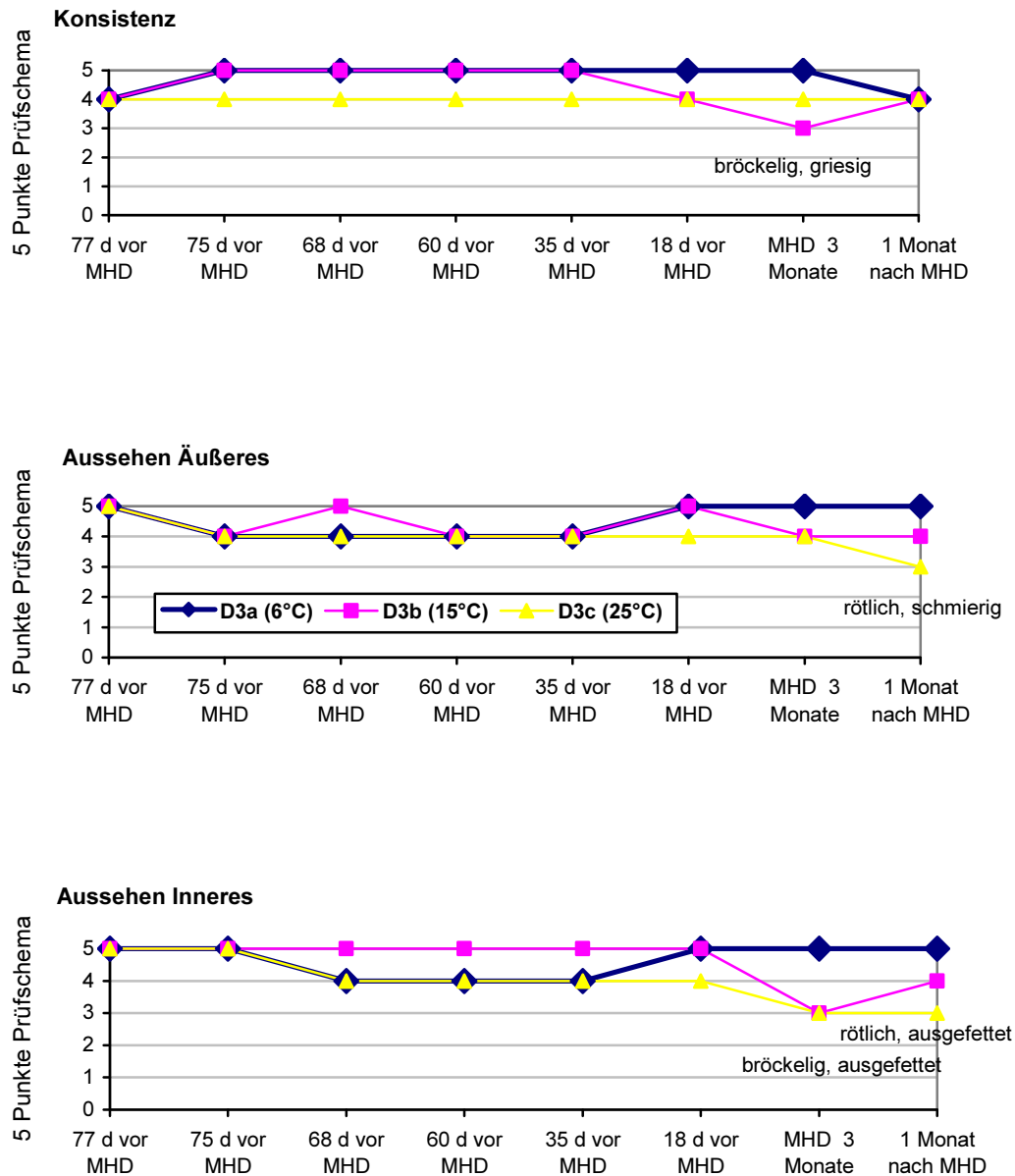


Abb.13: Sensorische Beurteilung des Französischen Fetakäse im Lagertest bei 6°C, 15°C und 25°C Lagertemperatur

### 6.3.4 Versuchsreihe D4 (Holländischer Fetakäse)

#### 6.3.4.1 Charakterisierung über pH-Wert, Salzgehalt, Hefen- und Staphylokokkenentwicklung

##### Hefenentwicklung

Der Hersteller garantierte eine Mindesthaltbarkeit von 6 Monaten. Bei den untersuchten Fetakäsen wurde der höchste Salzgehalt mit 4,4% nachgewiesen.

Hier war das breiteste Spektrum an Hefen vertreten, mit den größten Schwankungen zwischen  $10^0$  und  $10^6$  nachgewiesenen Hefen/g. Bis zum MHD waren das im Mittelwert bei 6°C Lagertemperatur  $6,5E+04$ , bei 15°C Lagertemperatur  $2,8E+04$  und bei 25°C Lagertemperatur  $2,4E+05$  Hefen/g.

Im Lagertest bei 6°C (D4a) konnten *Candida intermedia*, *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*), *Candida catenulata* und *Candida kefyr* (= *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*) identifiziert werden.

Bei 15°C (D4b) und 25°C (D4c) waren noch *Candida intermedia* und *Debaryomyces hansenii* vertreten.

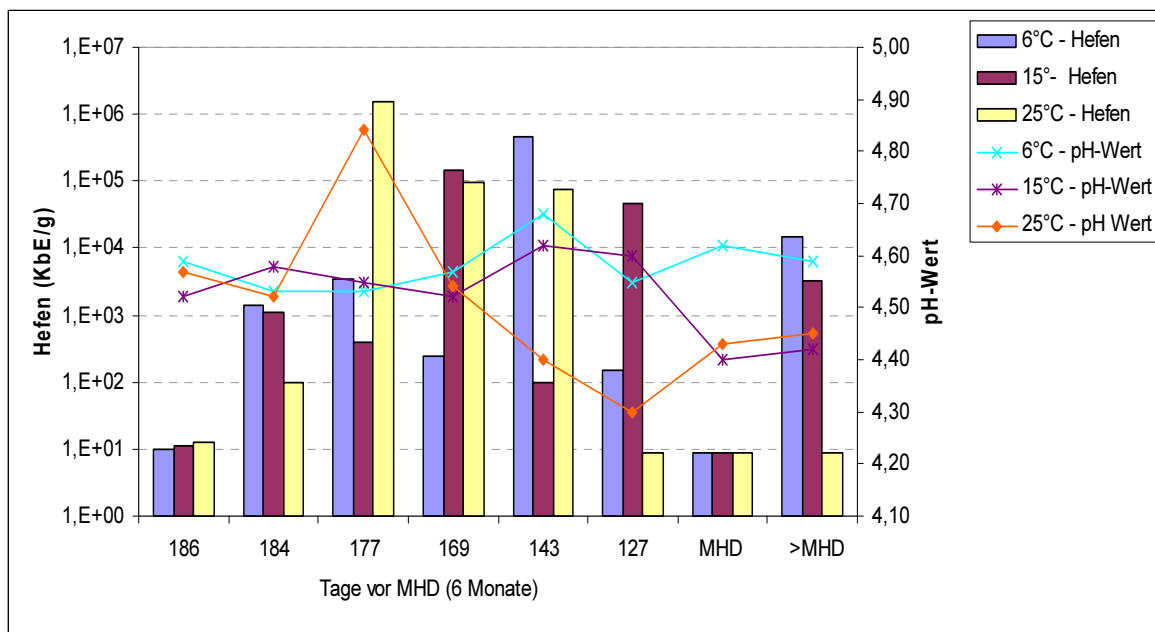


Abb.14: Holländischer Fetakäse, Hefen- und pH-Wert-Entwicklung

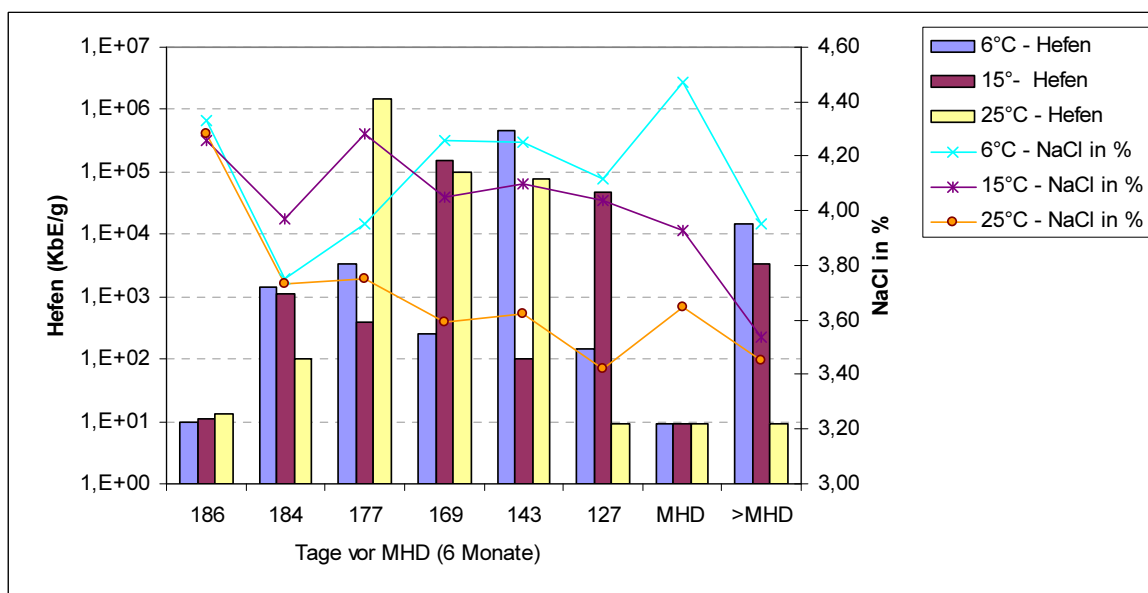


Abb.15: Holländischer Fetakäse D4, Hefenentwicklung und Salzgehaltsverlauf

### Staphylokokkenentwicklung

Im Anfangsbefund wurden zwischen 750 bis 880 *Staphylococcus aureus* pro g nachgewiesen, im weiteren Lagerungsverlauf traten bezüglich *S. aureus* keine Auffälligkeiten mehr auf.

Zum MHD (nach 6 Monaten) wurden bei 6°C Lagerungstemperatur (D4a) 98 *Staphylococcus hominis* pro g und bei 15°C Lagerungstemperatur (D4b) 320 *Staphylococcus warneri* pro g nachgewiesen.

Tab.11: Staphylokokkenentwicklung (KbE/g) im Lagertest bei 6°C, 15°C und 25°C

	186 d vor MHD	184 d vor MHD	177 d vor MHD	169 d vor MHD	143 d vor MHD	127 d vor MHD	MHD 6 Monate	1 Monat nach MHD
D4a	8,8E+02	<10	20	<10	<10	<10	98	<10
D4b	7,5E+02	<10	30	<10	<10	<10	320	<10
D4c	8,0E+02	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

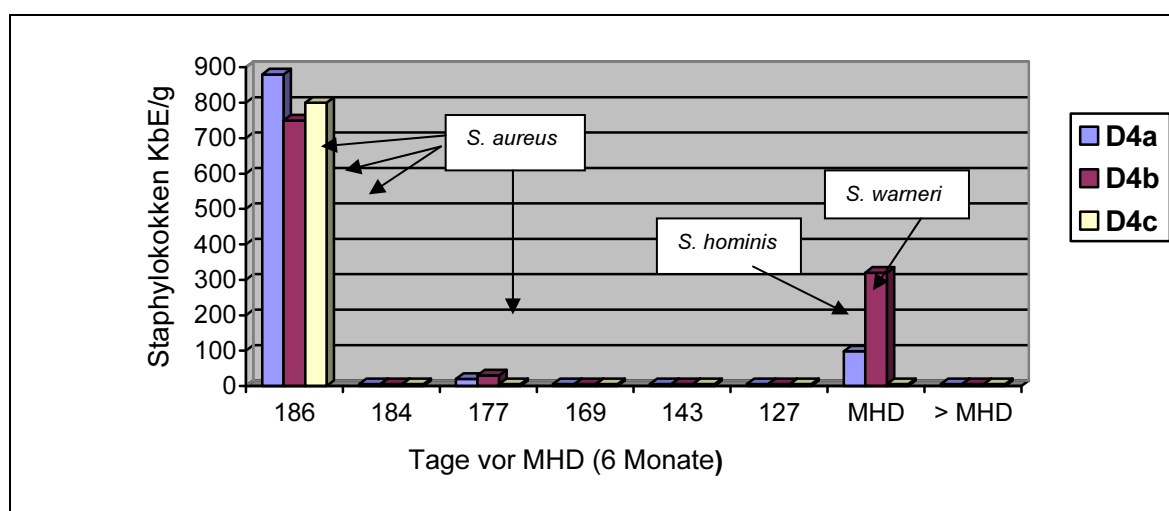


Abb.16: Nachweis der isolierten Staphylokokken im Lagertest

### 6.3.4.2 Sensorische Bewertung

#### Holländischer Fetakäse (D4)

Sensorische Qualitätsbewertung (Abb.17) in Abhängigkeit der Lagertemperatur und der isolierten Hefen.

Die sensorischen Abweichungen waren hier bei allen drei Lagertemperaturen am geringsten in allen Kriterien.

#### 25°C Lagertemperatur:

Erst am MHD wurden bei 25°C im „Aussehen Äußeres“ die Fehler „ausgeölt“ und „bunt“ angesprochen und mit 3 Punkten in diesem Kriterium deutlich abgewertet.

1 Monat nach MHD wurden im Geruch die Fehler „ranzelnd“ und „Fremdgeruch“ mit 3 Punkten und im Geschmack die Fehler „gärig“ und „ranzig“ mit 3 Punkten bewertet.

Isolierte Hefen:

*Candida intermedia* und *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*).

*Candida intermedia* (Bild 6) ist in der Lage zur Fermentation von Glucose und Galactose.

Glucose, Galactose und Lactose kann assimiliert werden. Herkunft ist Hautbesiedlung des Menschen, Erde, Meer und Trauben (Barnett et al. 1990).

*Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*), (Bild 4), ist in der Lage den Verderb von Milchprodukten durch Assimilation von Milchsäure und Hydrolyse von Casein zu bewirken (Boekhout et al., 2003). Diese Eigenschaften gehen konform mit den aufgetretenen Geschmacksfehlern „gärig“ und „ranzig“.

#### 15°C Lagertemperatur:

Vor Ablauf des MHD gab es nur einmal, 169 Tage vor MHD bei (D4b), im Geschmack die Vergabe von 3 Punkten durch die Fehler „salzscharf“ und „unrein“. Sonst wurde nichts beanstandet.

Isolierte Hefen:

*Candida intermedia* und *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*).

Die Kombination 15°C und der im Vergleich zu den anderen Fetakäsen höhere Salzgehalt bewirkten vermutlich, dass keine sensorischen Auffälligkeiten wie bei 25°C auftraten.

#### 6°C Lagertemperatur:

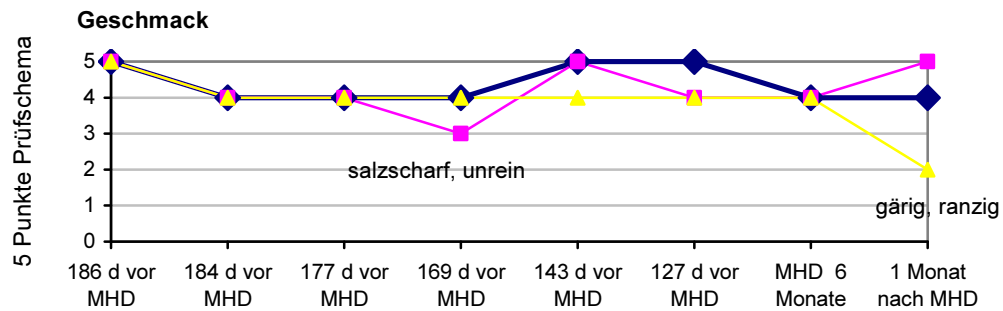
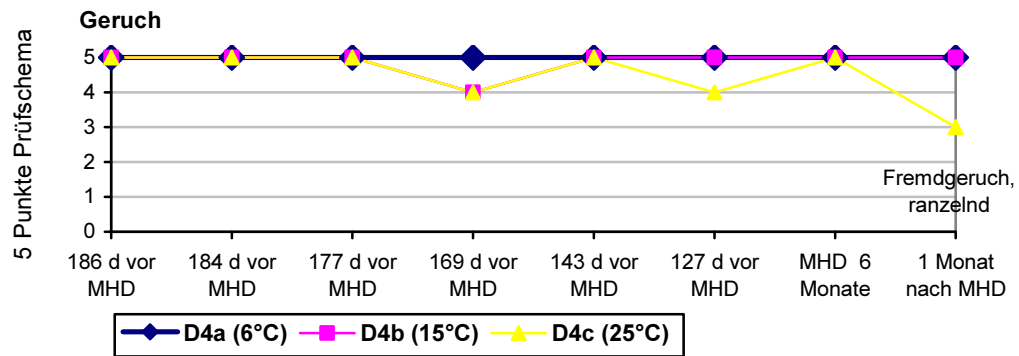
In der Zeitspanne 6 Monate vor bis 1 Monat nach MHD traten keine sensorischen Fehler auf.

Isolierte Hefen:

*Candida intermedia*, *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*), *Candida catenulata* (Bild 2) und *Candida kefyr* (= *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*).

Auch hier scheint die Kombination von Salzgehalt, Temperatur und pH-Wert so zu wirken, dass keine sensorischen Fehler nachweisbar waren.

Suriyarachchi et al. (1981) beschreiben, dass *D. hansenii* am tolerantesten gegenüber dem Kombinationseffekt pH-Wert, Salz und Temperatur zu sein scheint, was mit dem Befund des höchsten Salzgehaltes mit 4,4 % übereinstimmt.



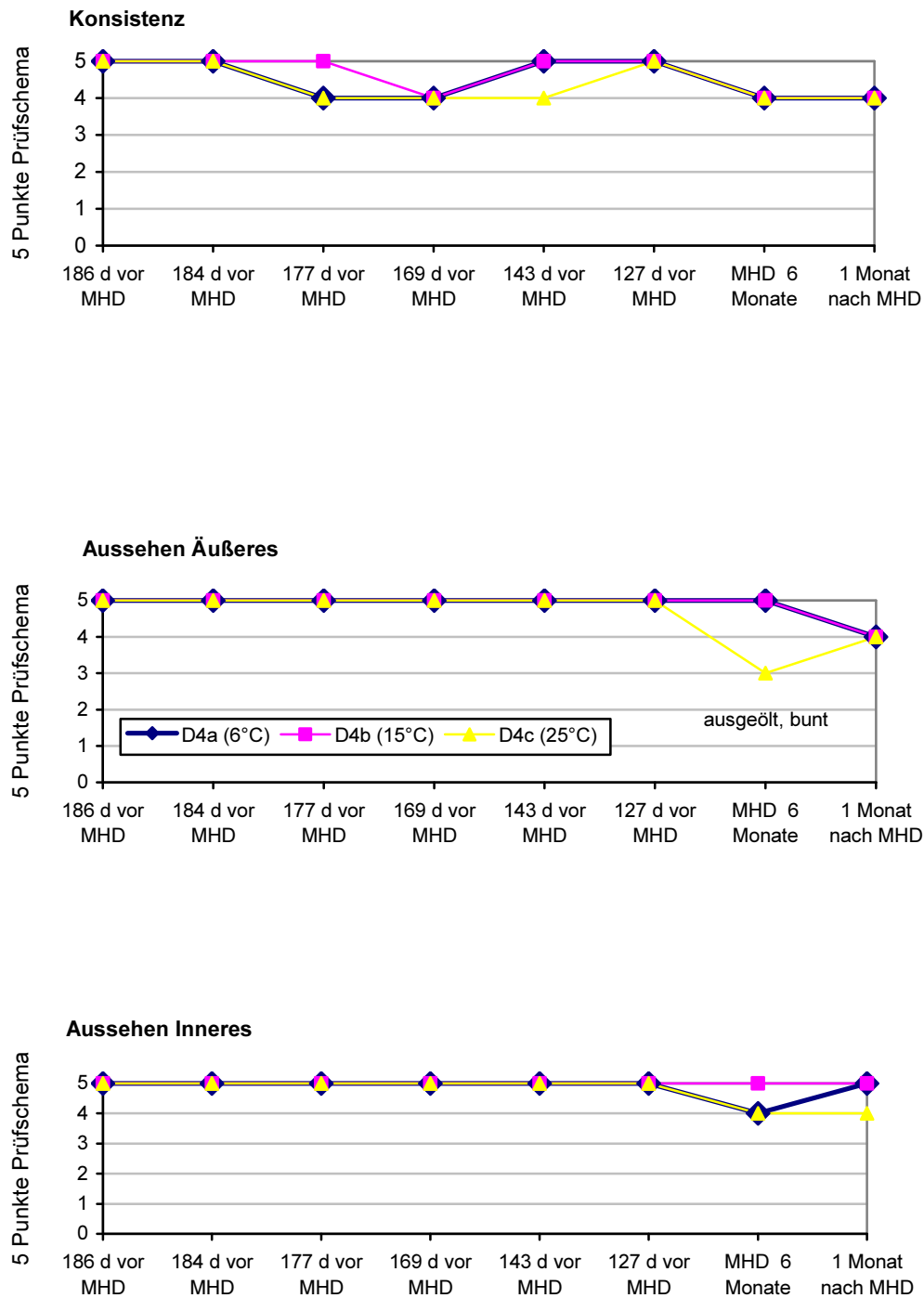


Abb.17: Sensorische Beurteilung des Holländischen Fetakäse im Lagertest bei 6°C, 15°C und 25°C Lagertemperatur

## **6.4 Kontaminationsversuche während der Reifung in Abhängigkeit von der Reifungstemperatur, dem pH-Wert und dem Salzgehalt der Lake**

Die Fetakäse wurden in der Lehrmolkerei unter gleichen technologischen Bedingungen (Abb.3) hergestellt, abweichend für die Kontaminationsversuche wurde der Salzgehalt in der Salzlake auf 8 bzw. 10% erhöht.

Die Kontamination der Salzlake und der Fetakäse mit *Staphylococcus aureus* erfolgte im Laborbereich.

### **6.4.1 Wachstumsverhalten von *Staphylococcus aureus* in Salzlake und auf der Käseoberfläche**

Der Einfluss des Salzgehaltes, des pH-Wertes und der Reifungstemperatur auf das Wachstumsverhalten von *Staphylococcus aureus* während der Reifungszeit wurde untersucht.

Der Salzgehalt in der Lake wurde auf 8 und 10% eingestellt, um im Käse 5%NaCl nicht zu überschreiten, was den sensorischen Fehler „zu salzscharf“ verursachen würde.

Die Reifungstemperatur wurde mit 10°C und 15°C den technologischen Möglichkeiten in Käsereien angepasst.

Die Anfangskontamination der Salzlake mit *Staphylococcus aureus* sollte bei ca.  $10^6$ /ml liegen, da diese Konzentration für Erkrankungen relevant ist (Eickhoff, 2005; Heesch, 2004). Die Kontamination der Salzlake erfolgte wie in Abschnitt 5.6.1 und 5.6.2.2 beschrieben.

Bei jeder Versuchsreihe lief stets eine Kontrollvariante ohne Kontamination mit *Staphylococcus aureus* mit, bei denen die Staphylokokken/g Käse und pro ml Salzlake unter der Nachweisgrenze blieben.

#### **6.4.1.1 Keimzahlentwicklungen in Salzlake mit 8% NaCl und Reifungstemperaturen von 10°C und 15°C**

Die dargestellten Ergebnisse setzen sich aus den Mittelwerten von jeweils 3 gleichlaufenden Versuchsansätzen zusammen (Tab. 12, 13 und Abb.18).

Über die kontaminierte Salzlake mit ca.  $10^5$ /ml *Staphylococcus aureus* bei 10°C und ca.  $10^6$ /ml *Staphylococcus aureus* bei 15°C wurde nach 24h eine Anfangskontamination auf der Käseoberfläche von ca.  $10^5$ /g *Staphylococcus aureus* nachgewiesen (5.5.1).

Die Keimzahlentwicklung blieb bei beiden Temperaturen sieben Tage stabil, innerhalb der darauf folgenden 7 Tage wurde eine Reduzierung um eine Zehnerpotenz erreicht und nach insgesamt 42 Tagen Reifungszeit eine Reduktion um eine weitere Zehnerpotenz festgestellt.

Bei 15°C und einer 8%igen Salzlake wurde die beste Reduzierung von *Staphylococcus aureus* nach insgesamt 56 Tagen auf  $10^3$ /g Käseoberfläche erreicht.



Tab. 12: Keimzahlentwicklung von *Staphylococcus aureus* während des Reifungsverlaufes bei 10°C (Salzlake 8% NaCl)

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V1-K [KbE/g]	0,0E+00	8,6E+04	8,0E+04	8,4E+04	1,4E+05	3,8E+04	1,0E+04	1,6E+04	1,9E+04	1,2E+03	2,7E+04	1,2E+04
V1-SL [KbE/ml]	7,0E+04	1,3E+05	7,7E+04	2,8E+04	1,8E+04	9,3E+03	3,1E+03	1,2E+03	3,0E+03	2,9E+02	1,7E+03	1,9E+03

Tab. 13: Keimzahlentwicklung von *Staphylococcus aureus* während des Reifungsverlaufes bei 15°C (Salzlake 8% NaCl)

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V2-K [KbE/g]	0,0E+00	2,6E+05	8,8E+05	6,1E+05	1,6E+05	2,4E+04	2,1E+03	4,5E+03	1,8E+03	6,9E+02	5,3E+03	3,1E+03
V2-SL [KbE/ml]	5,6E+05	6,6E+05	3,0E+05	3,3E+05	2,7E+05	1,5E+04	1,0E+03	4,1E+03	1,5E+03	1,3E+02	3,0E+02	1,2E+02

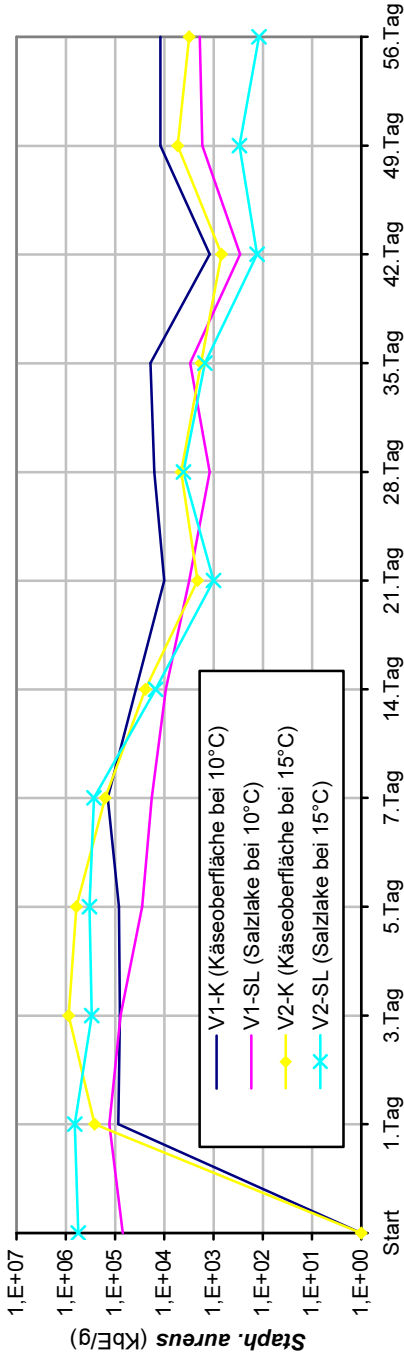


Abb. 18: Keimzahlentwicklung von *Staphylococcus aureus* über den Reifungsverlauf von 56 Tagen bei 10°C und 15°C Reifungstemperatur und 8%iger Salzlake (Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchsansätzen mit Doppelbestimmungen)

#### 6.4.1.2 pH-Wertverlauf

Ein pH-Wert-Bereich zwischen 4,15-4,50 und ein Ansteigen der Salzkonzentration im Fetakäse bis auf 6,21% nach 90 Tagen soll eine Reduzierung der meisten vorkommenden Mikroorganismen über den Reifungsverlauf bewirken (Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

Innerhalb der Versuchsreihen wurde zu Beginn nach dem Prozessleitplan (Abb.3) die Salzlake auf ca. pH 4,8 eingestellt (5.6.2.1).

Danach wurden über den Reifungsverlauf von 56 Tagen die Salzlake und die Käse bei 10°C und 15°C auf den pH-Wert überprüft (5.4.1).

In den Tabellen 14 und 15 sowie in der Abbildung 19 sind die pH-Werte mit einer 8%igen Salzlake dargestellt. Daraus ist zu erkennen, dass in den ersten sieben Tagen keine wesentlichen Änderungen im pH-Verlauf auftraten, was sich auch auf stabile Keimzahlwerte bei *Staphylococcus aureus* niederschlug (Abb. 18).

Danach sind nach insgesamt 14, 21 und 42 Tagen abnehmende Staphylokokkenwerte zu verzeichnen (Abb. 19).

#### 6.4.1.3 Salzgehaltsverlauf

Der Salzgehalt im Käse sollte aus sensorischen Gründen 5% nicht übersteigen. Mit einer Ausgangskonzentration der Salzlake von 8% NaCl sollte über den Reifungsverlauf von 56 Tagen diese Endkonzentration im Käse eingehalten werden. Der Salzgehalt wurde wie in Kapitel 5.4.2 beschrieben bestimmt.

Tabelle 16, 17 und Abbildung 20 zeigen den Salzgehaltsverlauf bei 10°C und 15°C während 56 Tage Reifungszeit.

Zum Ende der Reifungszeit hatte sich der Salzgehalt im Käse auf 4,5% stabilisiert, wobei sich innerhalb der Lagerungstemperaturen keine großen Abweichungen zeigten. Die Salzlake lag zum Reifungsende bei 6,6% NaCl.

Tab. 14: pH Wert-Entwicklung während des Reifungsverlaufes bei 10°C (Salzlake 8% NaCl)

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V1-K	4,82	4,67	4,71	4,73	4,70	4,81	4,79	4,78	5,09	4,75	4,86	4,91
V1-SL	4,96	4,95	4,95	4,96	5,00	5,13	5,24	4,90	5,20	4,86	5,07	5,05

Tab. 15: pH Wert-Entwicklung während des Reifungsverlaufes bei 15°C (Salzlake 8% NaCl)

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V2-K	4,68	4,60	4,59	4,60	4,66	4,63	4,64	4,72	4,56	4,54	4,99	4,85
V2-SL	4,40	4,88	4,83	4,89	5,04	5,02	4,78	4,79	4,57	4,49	5,04	5,00

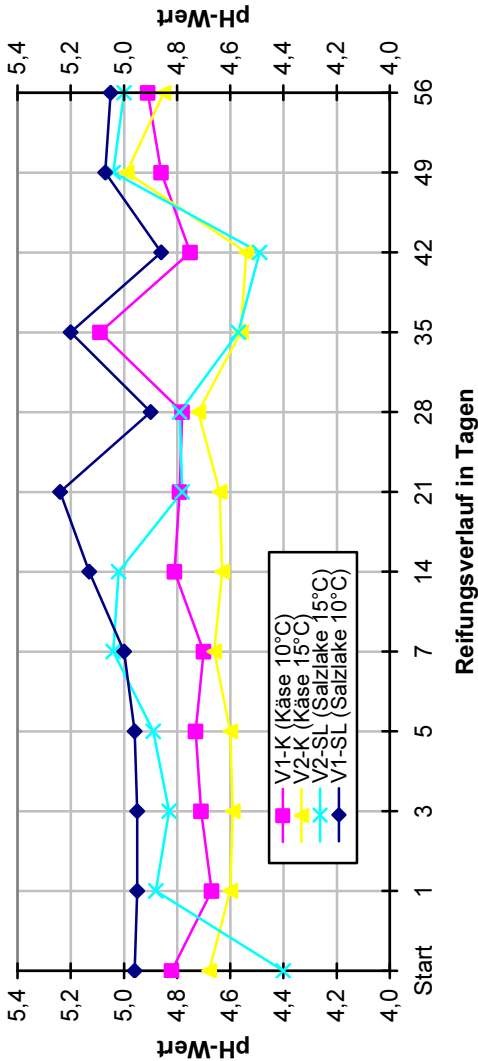


Abb. 19: pH-Wert-Entwicklung während des Reifungsverlaufes bei 10°C und 15°C Reifungstemperatur in der Salzlake und im Fetakäse (Mittelwerte von 3 Versuchsansätzen mit Doppelbestimmungen)

Tab.16: Salzgehaltsverlauf während der Reifung bei 10°C

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V1-K [%]	3,12	3,47	4,10	4,24	4,40	4,22	4,36	4,36	4,70	4,24	4,34	4,58
V1-SL [%]	8,31	7,24	6,96	6,89	6,97	6,66	6,62	6,86	6,79	6,48	6,58	6,60

Tab.17: Salzgehaltsverlauf während der Reifung bei 15°C

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V2-K [%]	2,20	3,33	4,00	4,11	4,00	4,21	4,40	4,20	4,14	3,88	4,40	4,45
V2-SL [%]	8,35	7,43	7,10	6,90	6,71	6,88	7,24	6,83	7,02	6,62	6,83	6,75

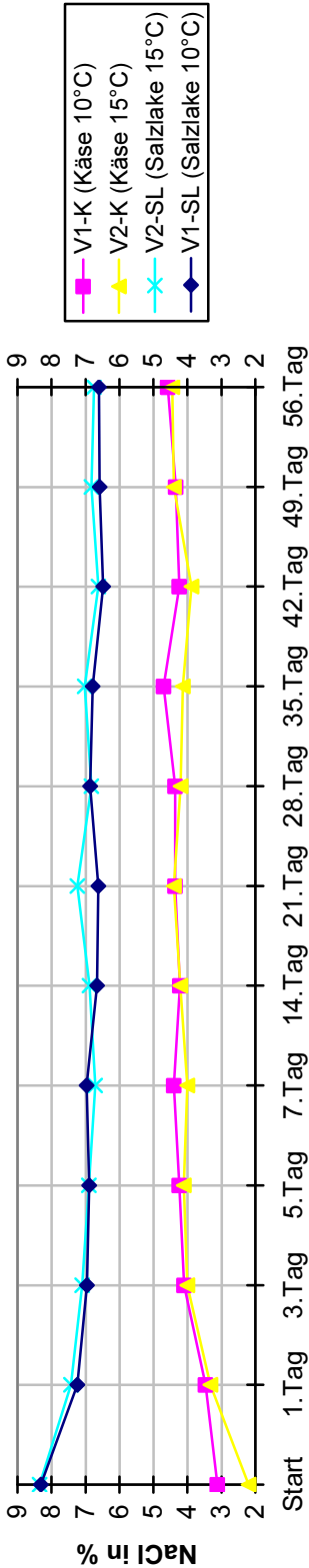


Abb. 20: Entwicklung des Salzgehaltes während des Reifungsverlaufes bei 10°C und 15°C Reifungstemperatur in der Salzlake und im Fetakäse (Mittelwerte von jeweils 3 Versuchsansätzen mit Doppelbestimmungen)

#### **6.4.2 Wachstumsverhalten von *Staphylococcus aureus* bei 15°C Reifungstemperatur und Salzlake mit 10% NaCl**

Auf Grund der vorangegangenen Untersuchungen (Abschnitt 6.4.1) bei 15°C mit einer 8%-igen Ausgangskonzentration der Lake, bei denen die beste Keimzahlminderung von *Staphylococcus aureus* erreicht wurden, sollte nun untersucht werden, ob durch eine Erhöhung der Salzlakenkonzentration (bei 15°C) eine noch bessere Keimzahlminderung von *Staphylococcus aureus* erzielt werden kann.

Die Fetakäse wurden nach Prozessleitplan (Abb.3) hergestellt, mit abweichender Salzlakenkonzentration, sonst wurden die technologischen Bedingungen wie in den Vorversuchen (6.4.1) gleich gehalten.

##### **6.4.2.1 Keimzahlentwicklungen während des Reifungsverlaufes**

In Tab. 18 und Abb. 21 sind die Keimzahlentwicklungen von *Staphylococcus aureus* in der Salzlake und auf der Käseoberfläche über 56 Tage Reifungsverlauf dargestellt.

Die *Staphylococcus aureus* Werte blieben 5 Tage auf gleichem Niveau, ca.  $10^5$ /g Käseoberfläche bzw. pro ml Salzlake. Nach insgesamt 7 Tagen reduzierte sich der Keimgehalt auf  $10^4$ /g, nach 28 Tagen auf  $10^3$ /g, nach 42 Tagen auf  $10^2$ /g und nach 49 Tagen auf  $10^1$ /g Käseoberfläche bzw. pro ml Salzlake.

##### **6.4.2.2 pH-Wertverlauf**

Die auf pH 4,0 eingestellte Salzlake stieg innerhalb von 24 h auf 4,8 und blieb dann 21 Tage stabil, sank dann auf 4,5 bis zum 42. Tag, um danach wieder auf 5,0 zu steigen (Abb. 21). Mit dem Anstieg des pH- Wertes auf 5,0 war eine deutliche Abnahme der *Staphylococcus aureus* Keimzahl verbunden.

##### **6.4.2.3 Salzgehaltsverlauf**

In Abb. 22 ist die Entwicklung des Salzgehaltes im Käse und in der Salzlake während der Reifungszeit bei 15°C Lagertemperatur und einer Anfangskonzentration der Salzlake von 10% NaCl dargestellt.

Über 56 Tage laufen die Kurven der NaCl Konzentrationen der Salzlake mit der Salzkonzentration im Käse konvergierend. Die Konzentration Salzlake sinkt in diesem Zeitraum auf 6,55% NaCl und steigt parallel im Käse auf 4,33 % NaCl.

Diese Werte genügen gut den technologischen und sensorischen Anforderungen und bestätigen die Studien von Litopoulou-Tzanetaki (1992), in denen keimmindernde Effekte mit Salzkonzentrationen von 6% und pH-Werten um 4,5 innerhalb 90 Tage beschrieben wurden.

Tab. 18: Keimzahlentwicklung von *Staphylococcus aureus* während des Reifungsverlaufes bei 15°C (Salzlake 10%NaCl)

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V3-K [KbE/g]	0,0E+00	1,2E+05	3,0E+05	3,8E+05	6,0E+05	1,2E+04	1,2E+04	2,5E+03	1,2E+03	6,6E+02	3,5E+01	2,1E+01
V3-SL [KbE/ml]	6,6E+05	6,3E+05	3,1E+05	1,8E+05	4,0E+04	4,7E+04	7,0E+04	3,1E+03	1,0E+03	1,1E+02	3,2E+01	1,3E+01

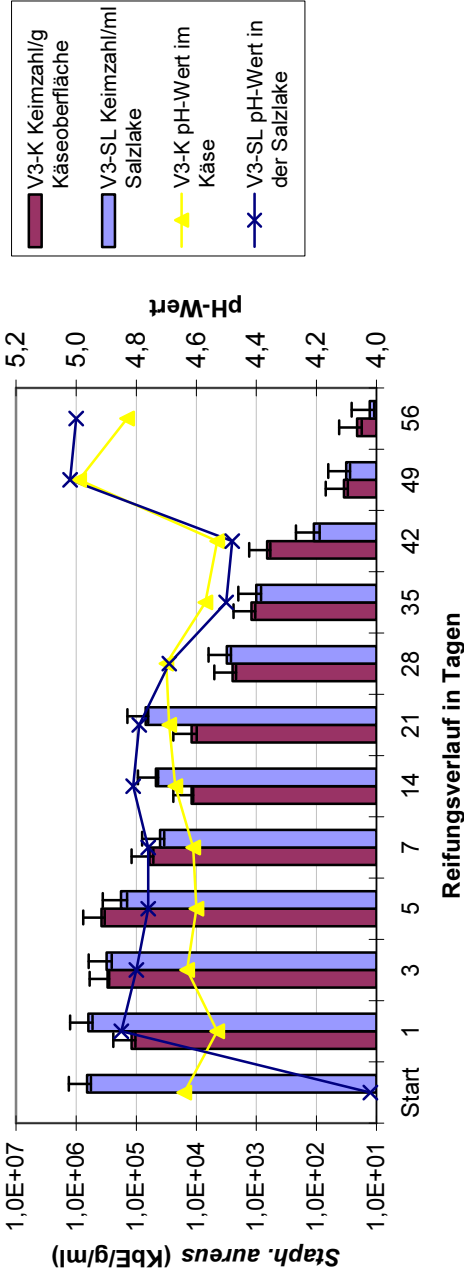


Abb.21: Keimzahlentwicklung von *Staphylococcus aureus* und pH-Wert-Entwicklung während 56 Tagen Reifung bei 15°C Reifungstemperatur und 10%iger Salzlake (Mittelwerte aus 3 Versuchsansätzen mit Doppelbestimmungen)

Tab. 19: pH-Wert-Entwicklung während des Reifungsverlaufes bei 15°C (Salzlake 10%NaCl)

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V3-K	4,64	4,53	4,63	4,60	4,61	4,67	4,69	4,70	4,57	4,53	4,99	4,83
V3-SL	4,02	4,85	4,80	4,76	4,76	4,81	4,79	4,69	4,50	4,48	5,02	5,00

Tab.20: Salzgehaltsverlauf während der Reifung bei 15°C

Bezeichnung	Start	1.Tag	3.Tag	5.Tag	7.Tag	14.Tag	21.Tag	28.Tag	35.Tag	42.Tag	49.Tag	56.Tag
V3-K [%]	2,12	3,13	3,97	4,43	4,49	4,42	4,80	4,60	4,44	3,98	4,40	4,43
V3-SL [%]	10,0	9,34	8,65	8,45	8,38	8,01	8,45	8,20	7,72	6,82	6,63	6,55

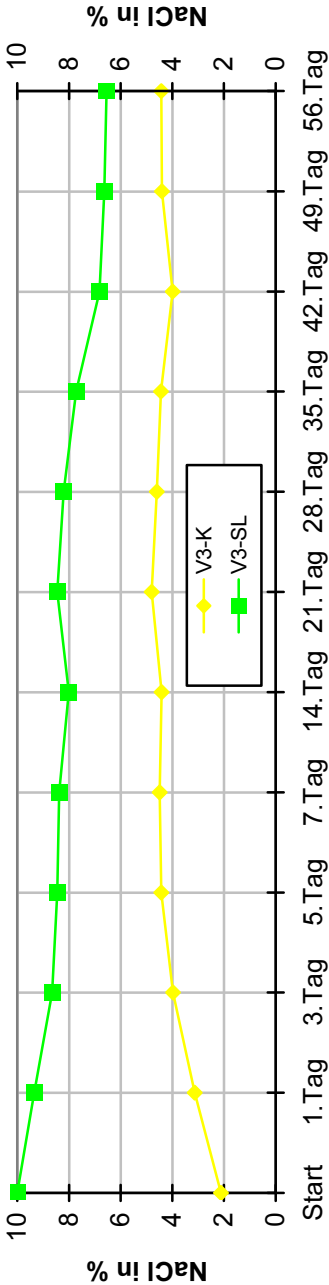


Abb.22: Entwicklung des Salzgehaltes während des Reifungsverlaufes bei 15°C Reifungstemperatur in der Salzlake und im Fetakäse (Mittelwerte von 3 Versuchsansätzen mit Doppelbestimmungen)

Parallel laufende Untersuchungen auf den Hefengehalt in diesen Versuchsreihen zeigten ein schnelles Ansteigen der Hefen bis zum 21. Tag; danach wurde eine Reduzierung auf  $10^3$ /g Fetakäse erkennbar. Der Vergleich ist in Abb. 23 zu sehen.

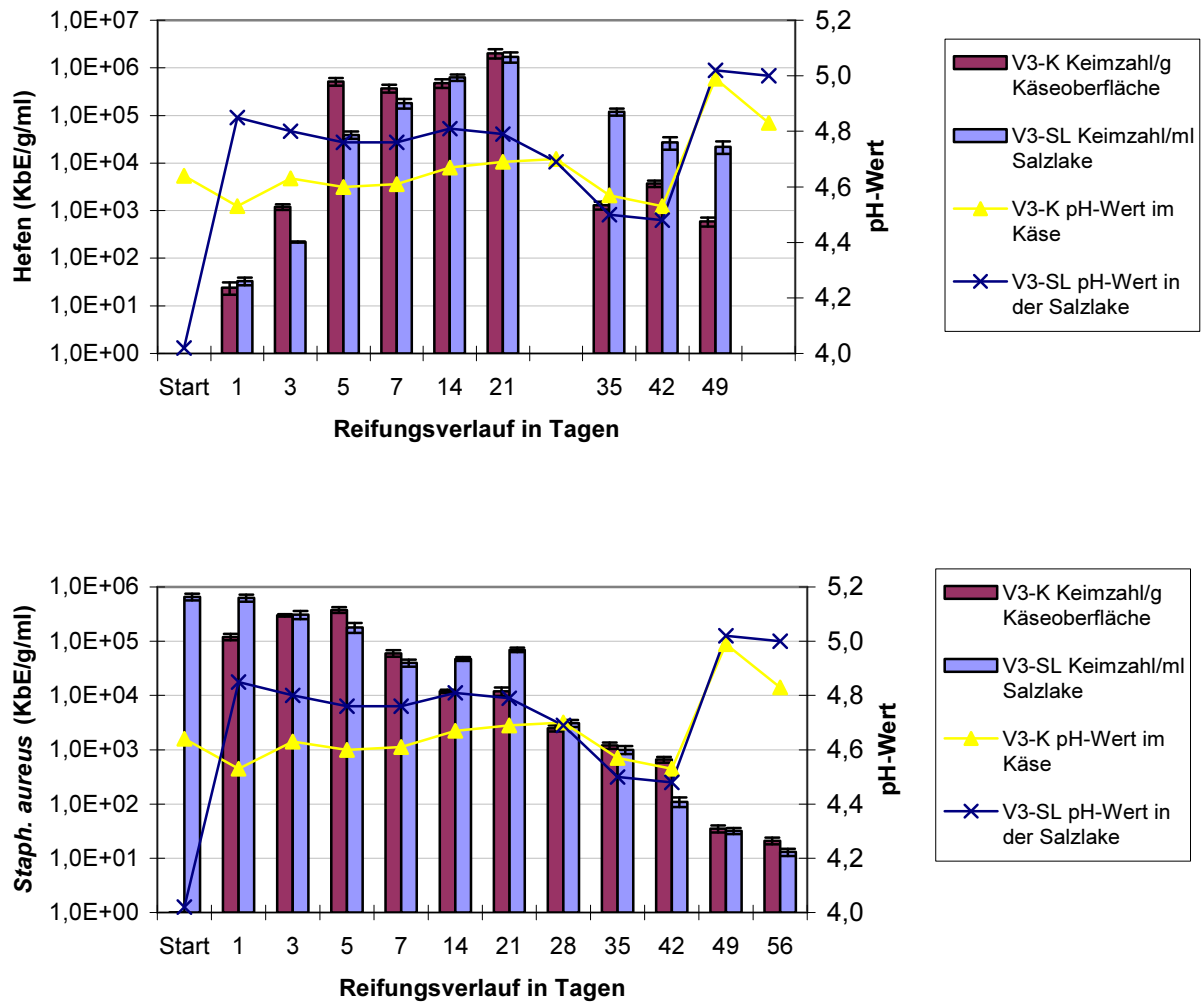


Abb. 23: Vergleichende Darstellung der Keimzahl- und pH-Wert-Entwicklung von Hefen und *Staphylococcus aureus* über den Reifungsverlauf bei 15°C Reifungstemperatur und 10%iger Salzlake (Mittelwerte aus 3 Versuchsansätzen mit Doppelbestimmungen)



## 7. Diskussion

### 7.1 Sichere Identifizierung der Hefen und Staphylokokken mittels geeigneter Methoden

Bei importierten Lebensmitteln ist es Aufgabe des Händlers, vom Verkaufsbeginn bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum die Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten. Im Rahmen von HACCP und Qualitätssicherungssystemen des Handels, wie z.B. International Food Standard (IFS), werden Lebensmittel aus dem Handel regelmäßig überwacht. Dabei werden chemische, mikrobiologische und sensorische Kriterien untersucht und die lebensmittelrechtlich vorgeschriebenen Deklarationen überprüft.

Die Überprüfung der Verkehrsfähigkeit ist dann schwierig, wenn für bestimmte Lebensmittel gesetzlich keine mikrobiologischen Grenzwerte festgelegt sind. Gerade Fetakäse, mit Mindesthaltbarkeiten von bis zu einem Jahr, muss über diesen langen Zeitraum genussstauglich sein.

Die unterschiedlichen hygienischen Bedingungen in den Herstellerländern machen sich auch in der Mikroflora des Fetakäse bemerkbar (Abdel-Fatah et al., 1998; Bintsis et al., 2000; Tzanetakis et al., 1992; Hayaloglu et al., 2002).

Hefen sind einerseits wichtig für die Entwicklung des typischen Geschmacks, können aber auch als Indikatoren einen Rückschluss auf mangelnde Hygiene und frühzeitigen Verderb geben (Pereira-Dias et al., 2000; Fadda et al., 2001).

Für Hefen gibt es demzufolge keinen Grenzwert in Fetakäse. Wird ein Fetakäse reklamiert wegen hefig-gärrigen Charakters, so kann eine außer Kontrolle geratene Kontamination vermutet werden, deren mikrobiologische Aufklärung zur Qualitätssicherung notwendig ist. Die Beurteilung der Verkehrsfähigkeit ist schwierig und kann ohne genaue Identifizierung der Hefen nicht erfolgen. Eine sichere und schnelle Keimidentifizierung ist daher in diesem Falle wichtig um gegebenenfalls den Verbraucher vor einer eventuellen gesundheitlichen Gefährdung zu bewahren.

Morphologische Merkmale für die Gattungs- und Artbestimmung der Hefen sind in der Regel nicht eindeutig genug. Zur eindeutigen Artbestimmung sind ergänzende physiologische Merkmale notwendig, wie die Fähigkeit bestimmte Kohlenhydrate unter CO<sub>2</sub>-Bildung vergären zu können (Fermentation), oder diese zu veratmen (Assimilation, Wachstum), die Verwertung von Stickstoff-Quellen, das Kulturverhalten und die Art der Vermehrung.

Basierend auf den Arbeiten von Lodder (1971), Barnett et al. (1974, 1979) sowie den Bestimmungsschlüsseln von Arx et al. (1977) ist die Bestimmung der Hefegattung mittels morphologischer Merkmale möglich. Die Artbestimmung erfolgt dabei bevorzugt mit physiologischen Tests. Ein Nachteil ist dabei, dass neue Erkenntnisse in der Taxonomie nur mit Verzögerung in den Bestimmungsschlüsseln berücksichtigt werden können.

In der Routinearbeit eines milchwirtschaftlichen Labors ist das Arbeiten mit Bestimmungsschlüsseln zu zeitaufwendig. Andererseits ist eine sichere

Identifizierung immer wichtiger für die Lebensmittelsicherheit in Rahmen von HACCP und Qualitäts-Sicherungssystemen (Zschaler, 2002).

Im Routinelabor wird oft für die Bestimmung von Hefen, nach der Isolierung aus dem Lebensmittel, die mikroskopische Kontrolle und die einfache Identifizierung über standardisierte miniaturisierte Systeme anhand von 32 Kohlehydraten verwendet.

Dieses System funktioniert dann gut, wenn die in der Datenbank hinterlegten Hefen mit den Hefen im Lebensmittel übereinstimmen. Die visuelle Beurteilung der Trübung gegen eine Nullkontrolle beinhaltet allerdings eine optische Fehlermöglichkeit, die das Differenzierungsergebnis zweifelhaft erscheinen lassen kann.

Gleiches gilt für die Identifizierung von Staphylokokken, die nach Vereinzelung und dem Überprüfen des Gram-Verhaltens dann mittels einer biochemischen Kontrolle über Substratverwertung und enzymatische Reaktionen über eine Datenbank überprüft werden. Limitierend sind auch hier die hinterlegten Stämme der Datenbank, die für medizinische Zwecke erstellt wurde und milchwirtschaftlich relevante Stämme oft nicht beinhaltet.

Immer häufiger werden deshalb auch in Routinelaboren zur schnellen und sicheren Identifizierung molekulare Identifizierungstechniken eingeführt (Zschaler, 2002).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) hat sich inzwischen zu einem der wichtigsten analytischen Instrumente für die Identifizierung von Mikroorganismen entwickelt.

Die PCR besitzt folgende Vorteile:

- Hohe Sensitivität; aufgrund der exponentiellen Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäuren kann theoretisch ein Molekül der Nukleinsäure im Probenansatz nachgewiesen werden.
- Hohe Spezifität der PCR durch die zur Initiation der Polymerisation verwendeten beiden Primer, welche exakt komplementär zu einem kurzen Nukleinsäureabschnitt sind. Je länger die verwendeten Primer, umso spezifischer die Reaktion (Heller, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Identifizierung der Hefen und Staphylokokken die beiden oben genannten Methoden herangezogen.

Als molekularbiologische Technik wurde die ARDRA-PCR (Amplified-Ribosomal-DNA-Restriction Analysis) angewendet, bei der mittels zweier spezifischer Primer ein Bereich amplifiziert wird, der das 3'-Ende der 16s-rDNA, die Spacerregion und einen Teil des 5'-Endes der 23s-rDNA umfasst. Die Gene für die 16 und 23 s RNA sind besonders geeignet, da sich hoch konservierte und stark variable Sequenzabschnitte abwechseln. Das amplifizierte Produkt wird durch Restriktionsverdau in Fragmente gespalten, die gattungs- oder speziesspezifisch sind (Deak et al., 2000; Heller, 2003; Rosec et al., 2002; Vasdinyei et al., 2003; Wyder et al., 1997).

Die Identifizierungsergebnisse in den Tabellen 6 und 7 verdeutlichen die oben genannten Aussagen. Über ARDRA konnten schnell und sicher aus Fetakäse isolierte Hefen und Staphylokokken identifiziert werden.

## **7.2 Untersuchungsergebnisse kommerzieller Fetakäse unter dem Gesichtspunkt der Verkehrsfähigkeit**

Die untersuchten Fetakäse wurden unter der Prämisse ausgewählt, dass

- es sich um Importware mit ausreichender
- Verfügbarkeit einer Charge im Handel und
- möglichst gleicher Abpackgröße und Verpackungsart handeln sollte.

Importierte Fetakäse aus den Herkunftsländern Bulgarien, Griechenland, Frankreich und Holland wurden bei unterschiedlichen Lagertemperaturen auf die mikrobiologischen Kriterien Hefen und Staphylokokken untersucht.

Da eine Vermehrung und Toxinbildung von Staphylokokken durch einen hohen Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Wassergehalt bei mittleren Temperaturen, zwischen 10°C - 48°C, begünstigt wird (Eickhoff, 2005), wurden Lagertemperaturen von 6°C, 15°C und 25°C gewählt und Lagerzeiten bis 1 Monat über das angegebene MHD hinaus festgelegt.

Mit Ausnahme des holländischen Fetakäses, der mit einem Abtropfgewicht von 400g in Dosen in den Handel gebracht wurde, waren die anderen Fetakäse folienverschweißt und zu 200g abgepackt.

Untersucht werden sollte ob durch die relativ langen MHD Spannen bei Fetakäse mikrobiologische wie sensorische Qualitätsschwankungen auftreten können und wenn Staphylokokken nachweisbar sind, diese eine Gefährdung für den Verbraucher darstellen. Dies war für die Verkehrsfähigkeit von Interesse, was im folgenden Punkt diskutiert wird.

### **7.2.1 Entwicklung der Hefen- und Staphylokokkenpopulation in Fetakäsen bei unterschiedlichen Lagertemperaturen über das MHD hinaus**

#### **Hefen im Lagertest:**

Hefen spielen als Verderbniserreger, aber auch als Aromabildner eine wichtige Rolle. Das vorhandene Salz in der Salzlake kann einen starken Einfluss auf den Stoffwechsel von Hefen mit organischen Säuren haben (Boekhout et al., 2003).

Die Proteolyse und Lipolyse wird als Schlüsselprozess in Bezug auf Geschmacks- und Texturentwicklung angesehen (Bintsis et al., 2003).

Eine Vielfalt von Hefen ist in der Lage sich in gekühlten, fermentierten Lebensmitteln auch bei niedrigem pH-Wert zu vermehren. In der Literatur gibt es aber nur wenige Daten über die Wechselwirkung von Salzgehalt, Temperatur und pH-Wert. Informationen über einzelne Effekte wie zum Beispiel der Temperatureinfluss auf das Wachstum der Hefen sind eher zu finden (Fleet, 1992).

Einige der Wenigen sind Beets et al. (1999). Sie haben sich mit der Wechselwirkung von pH-Wert, NaCl und Temperatur auf das Wachstum verderbniserregender Hefen befasst.

Dabei wurde die Wachstumsüberprüfung auf synthetischen Medien durchgeführt im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, die handelsübliche Fetakäse benutzte. Beets et al. (1999) variierten den pH-Wert zwischen 2,5 und 7, den Kochsalzgehalt der Lake von 0,4-8% NaCl und wählten Temperaturen von 8 und 22°C. Die Beurteilung des Wachstums wurde optisch über die Trübung in den Kavitäten von Mikrotiterplatten vorgenommen. Es zeigte sich, dass unter extremen Bedingungen die Wachstumscharakteristiken der *Candida* Spezies beträchtlich variierten. Zum Beispiel benötigte unter vergleichbaren Bedingungen *Candida guilliermondii* nur 1 Tag, im Gegensatz dazu benötigte *Candida holmii* 32 Tage, zum Wachstum. Ferner fanden sie, dass sich der synergistische Effekt zwischen pH-Wert und Salzgehalt bezüglich der Wachstumshemmung bei tiefen Temperaturen verstärkte, bzw. die Toleranz gegenüber höheren Kochsalzkonzentrationen innerhalb einer Art abnahm.

**Diese Aussagen unterstreichen die Wichtigkeit der sicheren Artbestimmung, da die Wachstumscharakteristiken innerhalb der *Candida* Spezies deutlich variierten.**

Eine präzise Identifikation der einzelnen Arten, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde, ist daher wichtig um ihren Einfluss auf mikrobiologische Veränderungen während der Mindesthaltbarkeit einschätzen zu können.

#### **Ergebnisse aus dem Lagertest:**

Von den identifizierten Hefen traten überwiegend *Candida* Arten auf, deren Hauptbedeutung nach Riemelt et al. (2003), die Bildung von intensiv fett- und eiweißspaltenden Enzymen ist.

- Lagertemperaturen von 25°C verursachten im Fetakäse vor Ablauf des MHD sensorische Fehler wie „ranzig“, „bitter“, „seifig“, „sauer“, und Konsistenzfehler wie „Molkennester“ und „bröckelig“.
- Die Anwesenheit der isolierten Hefen korrelierte überwiegend mit den sensorischen Abweichungen auf Grund artspezifischer Stoffwechselaktivitäten (6.3).
- Für die Beurteilung der Verkehrsfähigkeit ist die sichere Artbestimmung der Hefen ein wichtiges Hilfsmittel.
- Bei 15°C und 6°C Lagertemperatur traten erst zum Ende des MHD sensorische Abweichungen auf.
- Anhand der sensorischen und mikrobiologischen Ergebnisse der Lagerteste kann für Fetakäse eine Lagertemperatur bis maximal 15°C toleriert werden.

#### **Koagulase positive Staphylokokken im Lagertest:**

In dem Gutachten des ständigen Hygieneausschusses aus Österreich von November 2006 sind in einer Leitlinie mikrobiologische Kriterien für Milch und

Milchprodukte beschrieben. Die mikrobiologischen Kriterien dienen als Anhaltspunkt dafür, ob Lebensmittel und deren Herstellungs-, Handhabungs- und Vertriebsverfahren akzeptabel sind oder nicht.

Dabei wird zwischen Lebensmittelsicherheitskriterien und Prozesshygienekriterien unterschieden.

### **Weichkäse aus pasteurisierter Milch (Leitlinie, November 2006)**

	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>Häufigkeit</b>	<b>Untersuchungszeitpunkt</b>
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>a</sup>		n.n. in 25g	4	beim Verlassen des Betriebes
Koagulase(+)				
Staphylokokken <sup>b 12</sup>	100	1000	1	üblicherweise Ende Reifung
<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	100	1000	1	üblicherweise Ende Reifung
Schimmelpilze <sup>c</sup>		K.s.K*		am MHD

\* keine sichtbaren Kolonien

<sup>a</sup> Lebensmittelsicherheitskriterium laut Verordnung (EG) Nr. 2037/2005

<sup>b</sup> Prozesshygienekriterium laut Verordnung (EG) Nr. 2037/2005

<sup>c</sup> Prozesshygienekriterium laut Leitlinie

<sup>12</sup> Sofern Werte über 10<sup>5</sup> KbE/g nachgewiesen werden, ist die Partie auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen (n=5; c=0; m=M nicht nachweisbar in 25g).

Bei dieser Beurteilung werden *Listeria monocytogenes* als Lebensmittelsicherheitskriterium und Koagulase positive Staphylokokken als Prozesshygienekriterium eingestuft. Für Koagulase positive Staphylokokken werden der untere Grenzwert bei 100/g und der Höchstwert bei 1000/g angesetzt.

Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) veröffentlicht mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln. Sie bieten Leitwerte zur Beurteilung mikrobiologischer Befunde für einen großen Teil von Lebensmitteln, für die es keine rechtsverbindliche Norm gibt.

In der Ausgabe von November 2007 sind für den milchwirtschaftlichen Bereich Richt- und Warnwerte für aufgeschlagene frische Sahne angegeben, wobei für Koagulase positive Staphylokokken ein Richtwert von 100/g und ein Warnwert von 1000/g empfohlen wird.

In Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis sollen Koagulase positive Staphylokokken in 1g nicht nachweisbar sein.

Unter Berücksichtigung obiger Empfehlungen können die Ergebnisse des Lagertestes folgendermaßen beurteilt werden:

- Der bulgarische Fetakäse war innerhalb aller Temperaturbereiche über den gesamten Lagerzeitraum frei von Koagulase positiven Staphylokokken, also in diesem mikrobiologischen Kriterium einwandfrei.
- Im griechischen Fetakäse wurden einmalig 133 Tage vor MHD maximal 70 *Staphylococcus aureus*/g bei 15°C Lagertemperatur nachgewiesen, was jedoch in dieser Menge keine qualitätsmindernde oder gesundheitliche Relevanz im Produkt darstellt.

- Die Tendenz setzte sich beim französischen Fetakäse fort; ein einmaliger Nachweis 60 Tage vor MHD bei 15°C Lagertemperatur von 3990 *Staphylococcus aureus*/g Käse stellt auch hier kein gesundheitsgefährdendes Risiko dar, da der Wert kleiner 10<sup>4</sup>/g beträgt. Nach Heeschen (2004) sind für das Entstehen einer Staphylokokken-Intoxikation Keimzahlen von 10<sup>6</sup>/g Lebensmittel erforderlich.  
Der Warnwert 1000/g für das Prozesshygienekriterium wird zwar überschritten, da der Zeitpunkt des Auftretens aber 60 Tage vor MHD und nicht während der Reifezeit war, müsste hier noch nicht eingeschritten werden, auch auf Grund der Tatsache, dass die angegebenen Warnwerte Empfehlungen für nicht fermentierte Erzeugnisse bzw. Weichkäse ohne Salzlake darstellen.
- Im holländischen Fetakäse wurden Anfangsbefunde zwischen 750 bis 880 *Staphylococcus aureus*/g nachgewiesen. Im weiteren Lagerungsverlauf, traten bezüglich *Staphylococcus aureus* jedoch keine Auffälligkeiten auf. Zum MHD, (6 Monate) wurden bei 6°C Lagertemperatur 98 *Sc. hominis*/g und bei 15°C Lagertemperatur 320 *Sc. warneri*/g nachgewiesen. Auch hier stellt die Anzahl der gefundenen Staphylokokken keine Gefährdung für den Verbraucher dar.

Diese Ergebnisse bestätigen mikrobiologische Studien von Litopoulou-Tzanetaki (1992), bei denen die Zusammenwirkung zwischen pH-Wert und Salzlagenkonzentration auf die meisten in Salzlagenkäse vorkommenden Mikroorganismen erkannt wurden. pH- Werte im Bereich 4,15-4,50 und Salzkonzentrationen bis 6,21% bewirkten dabei eine rapide Reduzierung von *Staphylococcus aureus* auf der Käseoberfläche.

Staphylokokken stellten bei den hier aufgeführten Produkten während der Lagertests kein Problem für die Verkehrsfähigkeit / Lebensmittelsicherheit dar.

Unter der Voraussetzung, dass während des Herstellprozesses eine zügige Säureentwicklung durch die Starterkulturen erreicht wird, keine Rohmilch verwendet, sondern die Milch einer Wärmebehandlung unterzogen wird (Asperger, 1991; Heller, 1996) und die hygienischen Bedingungen einwandfrei sind, stellen Fetakäse über den langen MHD Zeitraum kein Lebensmittelerisiko dar, selbst wenn die Lagertemperaturen 15°C bzw. 25°C betragen.

Die pH-Werte blieben bei Lagertemperaturbedingungen von 6°C stabil zwischen 3,9 und 4,6.

Die Salzgehalte waren herstellerabhängig mit 2,5% am niedrigsten beim Griechischen Feta, gefolgt von 2,8% und 3% im Französischem Feta und 3,8%-4% im Bulgarischen und Holländischen Fetakäse.

Die Kombination von niedrigen pH-Werten und Salzgehalten zwischen 2,5 bis 4% bei Lagertemperaturen von 6-15°C verhindern effektiv eine gesundheitsgefährdende Vermehrung von *Staphylococcus aureus* innerhalb des MHD.

Ausblick:

Inwieweit *Listeria monocytogenes* in Salzlakekäs unter den hier beschriebenen Lagerbedingungen ein Lebensmittelsicherheitsrisiko darstellt, müsste in entsprechenden Kontrollversuchen zukünftig untersucht werden.

Erkmen (2001) wies auf die gesundheitliche Gefährdung durch *Listeria monocytogenes* Kontaminationen in kommerziell hergestellten türkischen Weichkäsen in Salzlake hin (1.3.4).

### 7.3 Kontaminationsversuche während der Reifezeit

#### 7.3.1 Einflussfaktor Salzgehalt der Lake

Mikroorganismen sind auf die Verfügbarkeit von freiem Wasser (Wasseraktivität=aw-Wert) angewiesen. Der aw-Wert sinkt mit steigendem Kochsalzgehalt und zugleich verlängert sich die Lag-Phase (Anlauf-Phase) der Mikroorganismen. Ihre Generationszeit wird erhöht und insgesamt die Stoffwechselaktivität vermindert (Asperger et al., 1998).

Obwohl bei den durchgeführten Versuchen die Starterkulturen nicht mit in die Untersuchungen einbezogen wurden, müssen sie bei der Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Fetakäse für die Kontaminationsversuche wurden mit einer mesophilen O-Kultur (Abb.3, Gliederungspunkt 5.6.2.1) mit *Lactococcus (Lc.) lactis* spp. *lactis* und *Lc. lactis* spp. *cremoris* hergestellt.

Nach Laan (1998) wird die Lys *p*-Na-Hydrolyseaktivität von Laktokokken beim Vorhandensein von Salzen stimuliert, während die Lactobazillen eine Hemmung zeigen.

Salzreiche Käse zeichnet in der Regel ein kräftiges Flavour aus. Dies ist nicht nur auf den Eigengeschmack des Kochsalzes zurückzuführen sondern auf die Wirkung des Salzes auf die Enzyme. Nach Kammerlehner (2003) fördert es anscheinend die Freisetzung bzw. Aktivierung mikrobieller Enzyme. Diese können dann vermehrt aromaaktive Substanzen bilden.

#### 7.3.2 Einflussfaktor pH-Wert der Salzlake

Der pH-Wert ist ein wichtiger Parameter der Salzlake. Die Ansäuerung der Salzlake hat einen konservierenden Effekt und reduziert wie gezeigt die Entwicklung unerwünschter Keime. Das Wachstum von Mikroorganismen hängt auch im Wesentlichen vom pH-Wert ab.

Kehagias et al. (1995) untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Starterkulturen auf die Qualität von Salzlakekäs. Zum Einsatz kamen 3 Starterkulturen:

- mesophile Kultur mit *Lc. lactis* spp. *lactis* und *Lc. lactis* spp. *cremoris*,
- thermophile Kultur mit *Sc. (Streptococcus) salivarius* spp. *thermophilus* und *Lactobacillus (Lb.) delbrueckii* spp. *bulgaricus*,

- Mischkultur mit *Lactobacillus (Lb.) delbrueckii* spp. *bulgaricus* und *Lc. lactis* spp. *lactis*.

Mit allen drei Kulturen konnte eine angemessene Säuerung erreicht werden. Der pH-Wert fiel in den Proben mit der thermophilen Kultur am schnellsten, stieg dann jedoch nach zweimonatiger Reifung schneller an, als bei den anderen beiden Proben. Die thermophile Kultur zeigte im Vergleich eine stärkere proteolytische Aktivität. Die Lake-Käse aus thermophilen Kulturen wurden sensorisch etwas schlechter bewertet als die der beiden anderen Proben.

### 7.3 3 Einfluss der Salzlake bei unterschiedlichen Temperaturen auf den Kontaminationskeim *Staphylococcus aureus* während der Reifezeit

Über 56 Tage wurde Fetakäse in gezielt kontaminierter Salzlake untersucht. Bei einem Ausgangssalzgehalt von 8% pegelte sich der Salzgehalt im Käse auf 4,58% bei 10°C und 4,45% bei 15°C ein.

Die Staphylokokkenpopulation blieb während 7 Tagen bei beiden Temperaturen relativ konstant, was sich auch im pH-Wertverlauf widerspiegelt. Nach diesem Zeitraum ist in der Tendenz ein erster Anstieg des pH-Wertes zu verzeichnen, was sich in einer Reduzierung der Staphylokokkenzahl niederschlägt (deutlich nach 35 Tagen zu erkennen). Ein erneuter Anstieg des pH-Wertes zwischen 42 und 49 Tagen reduziert die Staphylokokkenzahl um 3 Zehnerpotenzen (Abb.19).

Die besten Ergebnisse wurden bei 15°C mit 8,0% NaCl Anfangskonzentration der Salzlake erreicht. Hier reduzierte sich die Staphylokokkenanzahl in der Salzlake am deutlichsten auf  $1,2 \times 10^2$ /ml.

Darauf aufbauend wurden Versuche mit 10%iger Salzlake bei 15°C Reifungstemperatur durchgeführt. Alle anderen Versuchsbedingungen wurden gleich gehalten.

Unter diesen Bedingungen blieb die Staphylokokkenanzahl über 5 Tage auf einem Niveau, danach wurde eine kontinuierliche Abnahme beobachtet. Nach 35 Tagen war in der Salzlake von einem ausgehenden Staphylokokkengehalt von  $6,6 \times 10^5$  noch  $1,0 \times 10^3$  *Staph. aureus* pro ml nachweisbar.

Ein deutliches Ansteigen des pH-Wertes am 42. Tag bewirkte eine weitere drastische Reduzierung von *Staph. aureus* auf 30 und am 56. Tag auf 13 *Staph. aureus* /ml Salzlake (Abb.21).

Der pH-Wert Anstieg ist unter diesen Bedingungen auffällig. Vermutlich ist das Zusammenwirken der Stoffwechselaktivität von Hefen, Laktokokken der Starterkultur und der zugesetzten *Staphylococcus aureus* unter den dargestellten technologischen Bedingungen verantwortlich für den Zusammenbruch der *Staphylococcus aureus* Population.

*Staphylococcus aureus* ist offenbar im Vergleich zu den technologisch bedingt vorhandenen Hefen und Laktokokken, salz- und säureempfindlicher bei Reifungstemperaturen von 15°C und Anwendung einer 10%igen Salzlake in der Ausgangskonzentration mit einem pH-Wert von 4,6.

Eine weitere Erklärung für den beobachteten Zusammenbruch der *Staphylococcus aureus* Population könnte das Zusammentreffen mit den Hefen und der Säuerungskultur sein, die durch die erhöhte Temperatur von 15°C und 10% NaCl/pH 4,6 stimuliert werden, wie für Laktokokken bei Laan (1998) beschrieben.



Durch die Steigerung der Enzymaktivität und der damit verbundenen erhöhten Generationszeit der Hefen und Laktokokken vermindert sich die Stoffwechselaktivität, der pH-Wert steigt auf 5,0 und bewirkt den Zusammenbruch der *Staphylococcus aureus* Population.

## 7.4 Schlussfolgerungen

Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz stehen im Fokus beim Inverkehrbringen von Lebensmitteln. Mikrobiologische Kriterien dienen dabei als Anhaltspunkt dafür, ob Herstellungs- und Vertriebsverfahren akzeptabel sind oder nicht. Hierbei unterscheidet man zwischen Lebensmittelsicherheits- und Prozesshygienekriterien.

Importierte Fetakäse wurden einer MHD Untersuchung auf die mikrobiologischen Kriterien Hefen und Staphylokokken unterzogen, wobei Lagertemperaturen von 6°C, 15°C und 25°C angewendet wurden.

Die sichere Artbestimmung über moderne schnelle und sichere molekularbiologische Identifizierungsverfahren (ARDRA), die auch in mikrobiologischen Routinelaboratorien eingesetzt werden können, sind ein wichtiges Hilfsmittel für die Beurteilung der Verkehrsfähigkeit.

Die im Lagertest nachgewiesenen Hefen und Staphylokokken stellten bei allen oben genannten Temperaturbereichen kein Lebensmittelsicherheitsrisiko dar.

Lagertemperaturen von 25°C führten allerdings teilweise auf Grund deutlicher sensorischer Abweichungen zu einer Qualitätsminderung, die zu einer Aberkennung der Verkehrsfähigkeit geführt hätten.

15°C und 6°C Lagertemperatur sicherten bis zum Erreichen des MHD stabile Qualitätsmerkmale und somit verkehrsfähige Fetakäse.

Für den Handel könnte es von Interesse sein, bei Weichkäsen in Salzlake Lagertemperaturen bis maximal 15°C zu tolerieren. Als Lebensmittelsicherheitskriterium ist dabei jedoch der Einfluss von *Listeria monocytogenes* zu beachten. Erkmen (2001) wies auf deren Vorhandensein in türkischen Weichkäsen hin.

Aus oben genannten Gründen muss für diese Käse bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum wie vom Lebensmittelhersteller empfohlen, bei Angabe „gekühlt“, die Lagerung bei 9°C erfolgen.

Wichtig für den Prozessverlauf während der Reifezeit von Weichkäsen in Salzlake sind die Einflüsse von Temperatur, pH-Wert und Salzlagenkonzentration auf den möglichen Kontaminationskeim *Staphylococcus aureus*.

Hohe Anfangskonzentration in der Salzlake von *S. aureus* mit  $10^6$ /ml können über die Zeitspanne von 56 Tagen Reifungszeit über die Prozessführung beeinflusst werden.

Die schnelle Säuerung durch die Starterkultur und die Enzymaktivität der vorhandenen salztoleranten Hefen bei Reifungstemperaturen von 15°C und einem Salzgehalt von 10% in der Anfangssalzlake mit pH 4,6 reduzieren eine Kontamination mit *Staphylococcus aureus* deutlich.

## 8. Zusammenfassung

Staphylokokken können im Keimzahlbereich von  $10^5/\text{g}$  bis  $10^6/\text{g}$  Käse Lebensmittelvergiftungen hervorrufen. Da sie eine Toleranz gegenüber hohen Salzkonzentrationen haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob und welche Staphylokokkenpopulation bis zum Erreichen des MHD und einen Monat darüber hinaus im Fetakäse auftritt.

Da Lagertemperaturen auf die mikrobiologische Qualität und Haltbarkeit einen großen Einfluss haben, wurden Lagertests bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen der Keimzahlentwicklung der identifizierten Hefen- und Staphylokokkenpopulation und daraus entsprechende sensorische Mängel darzustellen.

Fetakäse aus Bulgarien, Griechenland, Frankreich und den Niederlanden wurden aus dem Handel als Proben gezogen.

Aus den Lagertests dieser Fetakäse, bei Temperaturen von  $6^\circ\text{C}$ ,  $15^\circ\text{C}$  und  $25^\circ\text{C}$  während der Mindesthaltbarkeit, stellte sich heraus, dass Staphylokokken, besonderes Augenmerk lag auf *Staphylococcus aureus*, keine gesundheitliche Gefährdung, während der vom Hersteller garantierten Haltbarkeitsdauer und sogar einen Monat darüber hinaus, darstellten. Im Anfangsbefund der Untersuchungen wurden bei einem Hersteller maximal 880 *Staphylococcus aureus*/g nachgewiesen; im weiteren Lagerungsverlauf wurden keine weiteren Auffälligkeiten beobachtet. Staphylokokken stellten für die hier untersuchten Fetakäse während der Lagertests auch bei extremen Lagerungsbedingungen kein Problem für die Verkehrsfähigkeit dar.

Eine schnelle und sichere Identifizierung der Staphylokokkenpopulation konnte über die molekularbiologische Analyse ARDRA-PCR (Amplified-Ribosomal-DNA-Restriction Analysis) erreicht werden. Dasselbe gilt für die Identifizierung der isolierten Hefen.

Hefen in ihrer „Doppelfunktion“ als Aromabildner und Verderbniserreger waren an sensorischen Fehlern bei  $25^\circ\text{C}$  deutlich vor Erreichen des MHD beteiligt und bewirkten bei dieser Lagertemperatur eine Qualitätsminderung, was zu einer Aberkennung der Verkehrsfähigkeit geführt hätte. Bei  $25^\circ\text{C}$  Lagertemperatur wurden *Candida colliculosa*, *Candida inconspicua*, *Candida holmii* (= *Saccharomyces exiguus*), *Candida sphaerica* (= *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*), *Candida intermedia* und *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*) in den verschiedenen Fetakäsen nachgewiesen.

Bei  $15^\circ\text{C}$  verzögerten sich die sensorischen Abweichungen bis kurz vor Erreichen des MHD, oder traten erst am MHD auf. Die nachgewiesenen Hefen wurden identifiziert als *Candida colliculosa*, *Candida holmii*, *Candida kefir* (= *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*), *Candida intermedia* und *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*).

Bei  $6^\circ\text{C}$  Lagertemperatur wurden bis zum MHD keine sensorischen Abweichungen festgestellt, obwohl die isolierten Hefen *Candida colliculosa*, *Candida holmii*, *Candida zeylanoides*, *Candida intermedia*, *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*), *Candida catenulata* und *Candida kefir* (= *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*) im Durchschnitt am höchsten waren und über den Lagerungszeitraum weniger Schwankungen aufwiesen.

In diesem ersten Teil der Arbeit konnten folgende Tendenzen erkannt werden:

Bei den Fetakäsen mit den höchsten Salzgehalten bis 4,4%, waren die sensorischen Abweichungen bei allen drei Lagertemperaturen am geringsten.

Bei 25°C führte ein Ansteigen des pH-Wertes auf pH 5,0 bis 5,7 zum Zusammenbruch der Hefepopulation. Gleichzeitig traten die sensorischen Fehler „schwammig“ in der Konsistenz und im Geschmack „bitter“ und „seifig“ auf, so dass ab diesem Zeitpunkt die Stoffwechselprodukte der übrigen Mikroflora, wie auch die Säuerungskulturen, den Verderb ausmachten.

Die Kombination Salzgehalt von ca. 4%, und pH-Wert zwischen 4,1 und 4,5 bei Lagertemperaturen von 6°C bis maximal 15°C garantierten bis zum MHD sensorisch fehlerfreie Fetakäsequalität.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Frage, ob dieser Kombinationseffekt von Salzgehalt, pH-Wertverlauf und Temperatureinfluss in der Salzlake das Wachstumsverhalten von *Staphylococcus aureus* während des Reifungsverlaufes beeinflusst.

Aufbauend auf die vorangegangenen Untersuchungen wurde Salzlake mit 8% NaCl als Ausgangskonzentration gewählt und die Reifungstemperaturen mit 10°C und 15°C den technologischen Bedingungen in den Käsereien angepasst. Anschließend wurde eine gezielte Kontamination der Salzlake mit *Staphylococcus aureus* vorgenommen. Der Ausgangskeimgehalt lag bei ca.  $10^6$ /ml Salzlake.

Über 56 Tage wurde Fetakäse in kontaminierter Salzlake untersucht.

Innerhalb dieser Versuchsreihen stabilisierte sich bei einem Anfangssalzgehalt der Lake von 8% im Fetakäse bei 10°C auf 4,58% und bei 15°C auf 4,45% NaCl.

Die beste Reduzierung der Staphylokokkenanzahl wurde bei 15°C und 8% NaCl Gehalt der Lake auf  $1,2 \times 10^2$  /ml erreicht.

Darauf aufbauend wurden weitere Untersuchungen mit 10% iger Salzlake als Ausgangskonzentration bei 15°C Reifungstemperatur durchgeführt. Alle anderen Kriterien wurden gleich gehalten.

Es konnte eine kontinuierliche Abnahme der Staphylokokkenpopulation beobachtet werden. Nach 35 Tagen waren in der Salzlake noch  $10^3$  *Staph. aureus*/ml nachweisbar. Ein deutliches Ansteigen des pH-Wertes nach 42 Tagen Reifungszeit bewirkte eine Reduzierung von *Staph. aureus* auf 30/ml und am 56. Tag auf 13 *Staph. aureus*/ml Salzlake.

Parallel laufende Untersuchungen der Hefenentwicklung im Fetakäse ergaben ein rasches Ansteigen der Hefen bis zum 21. Tag. Danach war eine leichte Reduzierung der Hefen zu verzeichnen, die am 49. Tag noch im Bereich von  $10^4$  /ml Salzlake lag.

Fazit:

Es zeigte sich, dass es möglich ist, während der Reifungszeit von Fetakäse durch die Kombination von Anfangssalzkonzentration der Lake, pH-Wert und Reifungstemperatur das Wachstumsverhalten von *Staphylococcus aureus* in der Salzlake zu beeinflussen.

Die Kombination von 10% NaCl-Gehalt in der Salzlake zu Beginn der Reifungszeit und Reifungstemperaturen von 15°C und den damit verbunden pH-Wert Anstieg auf pH 5,0 reduzieren deutlich ab 42 Tagen Reifungszeit *Staphylococcus aureus*.

## 9. Abstract

Staphylococci in cheese ranging in cell count from  $10^5/\text{g}$  to  $10^6/\text{g}$  may cause food poisoning. Since they have a tolerance to high salt concentrations, the objective of this work is to determine which populations of staphylococci appear during the period before the best-before date and one month beyond. Since storage temperatures have a great impact on the microbiological quality and the shelf life, storage tests were conducted at different temperatures in order to determine the relationship between the cell count development of the yeast and staphylococci populations identified and the corresponding sensory flaws.

Feta cheeses from Bulgaria, Greece, France and the Netherlands were taken from the markets as samples for testing.

From the storage tests conducted on these feta cheeses at storage temperatures of 6°C, 15°C and 25°C during the period preceding and up to the best-before date, it was determined that staphylococci with a particular focus on *Staphylococcus aureus*, presented no health risk during the extent of the shelf life guaranteed by the manufacturer and even one month beyond that. In the initial results of the examination of one manufacturer's cheese a maximum of 880 *Staphylococcus aureus*/g was detected; in the course of further storage there were no other noticeable problems. During the storage tests and even under extreme storage conditions staphylococci presented no problem for the marketability of the feta cheese tested here.

A rapid and definite identification of the staphylococci populations was obtained by implementing ARDRA (Amplified-Ribosomal-DNA-Restriction Analysis); the same is true for the identification of isolated yeasts.

Yeast in its "double function" as a flavour former and spoilage causing pathogen contributed to the sensory flaws at 25°C clearly before reaching the best-before date and at this storage temperature caused a deterioration in quality that would lead to the loss of marketability recognition. At 25°C storage temperature *Candida colliculosa*, *Candida inconspicua*, *Candida holmii* (= *Saccharomyces exiguus*), *Candida sphaerica* (= *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*), *Candida intermedia* and *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*) were detected in the different feta cheeses.

At 15°C sensory deviations were delayed until shortly before the expiration of the best-before date or did not appear before the best-before date. The yeasts detected were identified as *Candida colliculosa*, *Candida holmii*, *Candida kefir* (= *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*), *Candida intermedia* and *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*).

At 6°C storage temperature no sensory deviations were detected before the best-before date although the cell count of isolated yeasts *Candida colliculosa*, *Candida holmii*, *Candida zeylanoides*, *Candida intermedia*, *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*), *Candida catenulata* and *Candida kefir* (= *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*) was on the average the highest and showed less fluctuation during storage time.

During the first phase of the work the following tendencies were observed:

With feta cheeses having the highest salt content of up to 4.4%, the sensory deviations at all three storage temperatures were the slightest.

At 25°C an increase of the pH value to pH 5.0 and up to 5.7 led to the breakdown of the yeast population. Simultaneously the consistency became spongy and the flavour bitter and soapy so that from this point on the products of metabolism of the remaining micro flora as well as the fermenting cultures determined spoilage.

The combination of salt content at approx. 4%, a pH between 4.10 and 4.50 and storage temperatures from 6°C to maximum 15°C guaranteed the flawless sensory quality of the feta cheeses until the best-before date.

The second phase of the work focused on the combined impact of the salt content, the course of the pH and the temperatures in the brine on the growth development of *Staphylococcus aureus* during the ripening period. Based upon preceding tests, brine with 8% NaCl was selected as the initial concentration and ripening temperatures were adjusted to the technological conditions of the cheese dairies at 10°C and 15°C. Subsequently the brine was deliberately contaminated initially with approx.  $10^6$  *Staphylococcus aureus* /ml.

The feta cheese was tested over a period of 56 days in contaminated brine. During this series of tests at an initial salt content of the brine of 8% in the feta cheese at 10°C the salt content reached a level of 4.58% and at 15°C it stabilised at 4.45% NaCl.

The best reduction of Staphylococci cell count was shown at 15°C and 8%NaCl content i.e. to  $1.2 \times 10^2$  /ml.

Based upon that, further tests with the initial salt concentration of 10% brine and at 15°C ripening temperature were conducted. All other criteria were kept constant.

Here a continual decrease of the Staphylococci population was observed. After 35 days  $10^3$  *Staph. aureus*/ml was still detectable.

A distinct rise in the pH value after 42 days of ripening caused a reduction to 30 *Staph. aureus* /ml brine and on day 56 to 13 *Staph. aureus* /ml brine.

Parallel tests conducted on the development of yeasts indicated a rapid yeast increase until day 21; after that there was a slight decrease in yeasts that was still about  $10^4$  /ml brine on day 49.

It was evident that *Staphylococcus aureus* in the brine during the ripening time of feta cheese was influenced by combining the initial salt concentration of the brine and the ripening temperature.

The combination of 10% NaCl content in the brine at the onset of the ripening period and ripening temperatures of 15°C and a related increase of the pH value to 5.0 clearly reduced *Staphylococcus aureus* after the 42<sup>nd</sup> day.

## 10. Literaturverzeichnis

**Abdel-Fatah, A. A., Gouda, A., El-Zayat, A. I., Mehanna, N. Sh., Yassien, M.M.,** (1998) "Microbiological quality of raw materials in relation to quality of feta cheese" Egyptian J. Dairy Sci. 26, 309-318

**Asperger, H.** (1986) "Wirkungen von Milchsäurebakterien auf andere Mikroorganismen" Österr. Milchwirtschaft, Wiss. Beilage 1, 1-22

**Asperger, H.** (1991) "Zur Bedeutung des Kriteriums *S. aureus* in Käse" Milchw. Berichte 108, 138-144

**Asperger H., Heisteringer H.** (1998) „ Zur Bedeutung des Salzbadens für das Vorkommen von Listerien“, Deutsche Milchwirtschaft 49, 108-111

**Barnett, J.A., Pankhurst, R. J.** (1974) "A new key to the yeasts-A key for identifying yeasts based on physiological tests only" North-Holland Publ. Co., Amsterdam

**Barnett, J.A., Payne, R.W, Yarrow, D.** (1979) "A guide to identifying and classifying yeasts", Cambridge University Press, New York

**Barnett, J.A., Payne, R.W, Yarrow, D.** (1990) "Yeasts: characteristics and identification", Cambridge University Press, New York

**Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J.** (1999) "Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth", Food control 10(1), 27-33, Amsterdam, Elsevier

**Bintsis, T., Vafopoulou-Mastrogiannaki, E., Litopoulou-Tzanetaki, E., Robinson, R. K.** (2003) "Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine" Journal of Applied Microbiology 2003, 95, 68-77

**Bintsis, T, Litopoulou-Tzanetaki, E., Davies, R., Robinson, R. K.** (2000) "Microbiology of brines used to mature feta cheese", International Journal of Dairy Technologie 53, 106-114

**Bundesministerium für Gesundheit und Frauen** (Gutachten des Ständigen Hygieneausschusses) „Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte“, November 2006, S. 2-20, Österreich PDF

**Busch-Stockfisch, M.,** (2005) "Sensorik in der Produktentwicklung und Qualitätssicherung", B. Behr's Verlag Hamburg, S. 1-17

**Boekhout, T., Robert, V.** (2003) "Yeasts in Food", B. Behr's Verlag Hamburg, 209-229

**Codex-Alimentarius**, 37.Akt.-Lfg./Stand: 1.1.2000, CODEX STAN 208-199, Codex-Gruppenstandard für Käse in Lake, F II-13, S. 1-3

**Davenport, R. R.**, (1998) „Microbiology of soft drinks“, Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices (edited by Ashurst P.R.) Sheffield, U.K., Sheffield Academic Press & CRC Press Boca Raton (1998), 197-216

**Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie**

„DGHM Richt- und Warnwerte“, Stand 2007, Internet Uni Bonn

**Deak, T., Chen, J., Beuchat, L. R.** (2000) „Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry meat“ Centre for Food Safety, Internet Yeast Research

**DIN 10 952** (1983), Bewertende Prüfung mit Skale Teil 1 und Teil 2

**Eickhoff, M.** (2005) „Staphylokokken Enterotoxin - alles Käse?, Hygiene Report 3 (2005), 19-21

**Erkmen, O.**, (1996) “Survival of virulent *Yersinia enterocolitica* during the manufacture and storage of Turkish Feta cheese”, International Journal Food microbiology, 33 (2-3), 285-292

**Erkmen, O.**, (2001) “Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Turkish White cheese “Nahrung, 45 (1), 55-58

**Fadda M. E., Cosentino S., Deplano M., Palmas F.**, (2001) “Yeast population in Sardinian feta cheese” International Journal of Microbiology 69 (2001), 153-156

**Fleet, G. H.** (1992) “Spoilage yeasts”  
Critical Reviews in Biotechnology 12(1/2), 1-44

**Fox, P.F., Wallace, J. M., Morgan, S., Lynch, C. M., Niland, E. J., Tobin, J.** (1996) “Acceleration of cheese ripening, Proceedings of the Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, held in Veldhoven, Netherlands, 8.-12. September 1996, Antonie van Leeuwenhoek 70:271-297

**Georgakis, S. A.**, (1982) “Traditionelle und neuzeitliche Herstellungstechnologie des Fetakäse”, Deutsche Molkereizeitung 31, 1048-1054

**Grieve, P.A., Kitchen, B.J., Dulley, J.R., Bartley, J.**, “Partial characterization of cheese-ripening proteinase produced by the yeast *Kluyveromyces lactis*, J. Dairy Res. 50 (1983), 469-480

**Güth, O.** (2006) “Feta, ein “All-Länder-Käse”?”, Internet, Redaktion Europa-Digital.de

**Hayaloglu, A. A., Guven, M., Fox, P.F.**, (2002) “Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese ‘Beyaz Peynir’” International Dairy Journal 12, 635-648



- Heeschen, W.** (2004) "Lebensmittelinfektionen und – intoxicationen. Darstellung der Fakten von Krankheitserregern mit milchhygienischem Bezug." S. 20-22, Vortrag anlässlich der Sitzung des Verbandsausschusses des Verbandes der deutschen Milchwirtschaft e.V. am 19. April 2004 in Bonn
- Hoppe-Seyler, T.S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W.H., Geis, A., Heller, K.J.** (2003)  
„Molecular Identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin“
- Heller, K. J.**, (1996) „Gentechnik und biologische Sicherheit in der Milchwirtschaft“, Deutsche Milchwirtschaft, 47: 282-284
- Heller, K. J.** (2003) „PCR-Analytik in der Mikrobiologie, Stand der Erfahrungen“ Vortrag, Kempten, Inter LAB
- Hoppe-Seyler, T.S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W.H., Geis, A., Heller, K.J.** (2002)  
„Identification and differentiation of species and strains of *Arthrobacter* and *Microbacterium barkeri* isolated from smear cheese with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE)“. Syst. Appl. Microbiol. in press
- Jermi, M. F. G., Domeniconi, F., Bissig, F., Jäggli, M.** (1990) "Hygienische Risiken durch Formaggini aus kleingewerblicher Produktion im Kanton Tessin: Enterotoxigene *S. aureus*- und *E. coli* Stämme." Mitt. Gebiete Lebensm. Hygiene 81, 633-654 (1990)
- Kammerlehner, J.** (2003) „Käsetechnologie“, S. 208-210, Verlag Freisinger Künstlerpresse W. Bode, Freising
- Kasapis, S. and Bosokou, D.** (2001), "Rheological and sensory properties of popular Greek foodstuffs: A Review", International Journal of Food properties 4 (2), 327-340, New York
- Kehagias, C., Koulouris, S., Samona, a., Malliou, s., Koumoutsos, G.** (1995)  
"Effects of various starters on the quality of cheese and brine", Food Microbiology 12 (5), 413-420
- Laan, H., Tan Saweng, Bruinenberg, B., Limsowtin, G., Broome, M.** (1998)  
„Aminopeptidase activities of starter and non starter lactis acid bacteria under simulated cheddar-cheese ripening conditions“, International Dairy Journal 8 (4), 267-274
- Laß, R.** (2003) Standardarbeitsanweisung zur Herstellung von Fetakäse in der Lehrmolkerei
- Lemieux, L., und Simard, R. E.**, (1992) „ Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition.“  
Lait, 72:335-382

**Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N.** (1992) "Microbiological study of white-brine cheese made from raw goat milk", *Food Microbiology* 9, 13-19

**Lodder, J.** (1971) "The yeasts, a taxonomic study", North-Holland Publ. Co., Amsterdam

**Mair-Waldburg,**(1974) "Handbuch der Käse", Volkswirtschaftlicher Verlag München,1974, S. 434

**Mann, E.** (1999) „Feta cheese“, *Dairy Industries International* 64 (3), 11-12

**Mauropoulos, A. A., Arvanitoyannis, I. S.** (1999) "Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines", *Food Control* 10 (3), 213-219, Thessaloniki, Greece

**Nascimento, M., Moreno, I., Kuaye, A.** (2008) "Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking" *International Journal of Dairy Technology* 61 (4) ,352-356

**Oehmichen, A.** (2002) "Hefen in Griechischen Fetakäse" Stellungnahme und persönliche Mitteilung, Niebüll

**Öner, Z., Karahan, A.G., Aloglu, H.** (2006) „Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening“ *LWT* 39 (2006), 449-454, Elsevier

**Papadopoulou, C., Maipa, V., Dimitriou, C., Pappas, C., Voutsinas, L. und Malatou, H.** (1993), "Behavior of Salmonella enteritidis during the manufacture, ripening, and storage of Feta cheese made from unpasteurized ewes' milk", *Journal Food protection*, 56 (1), 25-28

**Pereira-Dias S., Potes M. E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro V.,** (2000) "Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes cheese" *International Journal of Food Microbiology* 60 (2000), 55-63

**Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., Cocolin, L.** (2008) "Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers", *International Journal of Food Microbiology* 126 (2008) 36-42

**Rieke, J. W.** (2005) "Feta, Gattungs- oder Ursprungsbezeichnung ?", *Deutsche Milchwirtschaft* 11/2005 (56) S. 448

**Riemelt, I., Bartel, B., Malczan, M.** (2003), „Milchwirtschaftliche Mikrobiologie“, Behr's Verlag, Hamburg (2003), 166-175

**Robinson, R.K. und Tamime, A. Y.** (1991), "Feta and related Cheeses", Ellis Horwood Ltd, Chichester,

- Roostita, R., Fleet, G.H.** (1999) "Growth of yeasts isolated from cheeses on organic acids in the presence of sodium chloride", *Food Tech. Biotechnology* 37 (1999), 73-79
- Roostita R., Fleet G. H.**, (1996) "Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition"  
*International Journal of Food Microbiology* 31 (1996), 205-219
- Rosec, J. P., Gigaud, O.**, "Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France", *International Journal of Food Microbiology* (2002) 77 (1/2), 61-70 Amsterdam, Netherlands
- Römpf**; „Lexikon Lebensmittelchemie“, S. 751
- Suriyarachchi, V.R., Fleet, G.H.**, "Occurrence and growth of yeasts in yogurts", *Appl. Environ. Microbiology* 42 (1981), 574-579
- Turbett, G.R. and Sellner, L.N.** (1996) "Digestion of PCR and RT-PCR products with restriction endonucleases without prior purification or precipitation", *Promega Notes Magazine*, 60:23
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E.** (1992) „Changes in numbers and kinds of Lactic Acid Bacteria in Feta and Teleme, two Greek Cheeses from Ewes' Milk“ *J. Dairy Science* 75, 1389-1393
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A.**, (1991) "Effect of *Pediococcus pentosaceus* on Microbiology and Chemistry of Teleme Cheese", *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 24, 173-176
- Tzanetakis, N., Hatzikamari & Litopoulou-Tzanetaki E.** (1998) "Yeasts of the surface microflora of Feta Cheese" S. 34-42, *International Dairy Federation*, 1998 ISBN 92 9098 027 X
- Vasdinyei, R., Deak, T.** (2003) „Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques“, *International Journal of Food Microbiology*, 86 (2003), 123-130
- Vaneechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssen, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., Kersters, K.** (1992) "Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)" *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 227-234
- VDLUFA Methodenbuch**, Band VI,6. Erg. 2003, Methode C 10.6.3 "Bestimmung des Chloridgehaltes von Käse"
- von Arx, J. A., Rodrigues de Miranda, L., Smith, M. Th., Yarrow, D.** (1977) "The genera of yeasts and the yeast-like fungi", *Studies in Mycology* No. 14, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn
- VO (EWG) Nr. 2081/92**

**VO (EG) Nr. 1829/2002**

**Wyder, M.-T., Puhan, Z.** (1997) „A rapid method for identification of yeasts from kefir at species level“  
Milchwissenschaft 52 (6), 327-330

**Zangerl, P., Ginzinger, W.** (2001) “*Staphylococcus aureus* in Käse – eine Übersicht” Ernährung/Nutrition, Vol 25/ Nr. 10 (2001)

**Zschaler, R.** (2002) „Nachweis von Mikroorganismen durch PCR-Technik“  
Deutsche Milchwirtschaft 13 (53), 542-544

---

## Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. J. Heller für die Themenstellung, die wertvollen Anregungen und Hilfestellungen sowie die Betreuung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. K. Schwarz danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für weitere wertvolle Hinweise.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie (Max-Rubner-Institut Kiel), besonders Herrn Dr. W. Bockelmann, Herrn Dipl. Ing. P. Willems und Frau Dipl. Biol. B. Jäger danke ich für das Interesse, die Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die mir als externe Doktorandin während der Bearbeitung der Versuchsreihen entgegen gebracht wurde.

Herrn Dr. C.-L. Riedel danke ich für die stete Unterstützung bei der Landwirtschaftskammer NRW nebenberuflich eine Dissertation anfertigen zu können.

Frau Bela und Herrn Dr. C.-L. Riedel, Danke für die zahlreichen Literaturhinweise.

Allen Mitarbeitern der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Krefeld danke ich für das gute Arbeitsklima, welches eine nebenberufliche Anfertigung einer Dissertation erst möglich machte. Danke allen Laboranten, Herrn A. Mischo, Frau D. Kox, Frau E. Rosin, Frau I. Förster und Frau M. Kröckert.

Frau Dr. M. Ebert, Herrn Dipl. Ing. Ch. Bauer und Herrn R. Lass ganz herzlichen Dank für die moralische, sensorische und fachliche Unterstützung im Labor- und Lehralltag.

Rüdiger Lass gebührt besonderer Dank! Rüdiger, ich weiß nicht, was ich ohne Deine aufmunternden Sprüche und Deine tatkräftige Hilfe bei den technologischen Versuchsreihen im Technikum gemacht hätte.

Herrn Dr. W. Ebert, Herrn Prof. Dr. G. Kämpf und Herrn E. Schuster danke ich ganz besonders für die konstruktiven Hinweise, nächtelange Diskussionen und Korrekturen an den verschiedenen Versionen der Doktorarbeit.

Danke an Marilyn Reverchon für die Unterstützung beim englischsprachigen Teil der Arbeit.

Meiner Familie ganz lieben Dank, sie haben nie gezweifelt.

Herrn Müller von der Fa. Käse-Import Müller-Moers GmbH & Co. KG danke ich für die großzügige Bereitstellung verschiedener Fetakäse für Versuchsreihen.

Herrn Mies und seinem Team der Druckerei der LWK ganz herzlichen Dank für den Druck der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich Herrn Dr. K. Zickrick, der den Grundstein für meine mikrobiologischen Vorlieben während des Studiums an der Humboldt Universität zu Berlin gelegt hat.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Vorname	Ulrike
Name	Hakl
Geburtsdatum	15.02.1958
Geburtsort	Weimar / Thüringen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### Schule

1964-1975	Allgemeinbildende polytechnische Oberschule Weimar
1977-1979	Volkshochschule Erfurt, Abendstudium Abitur Abschluss Abitur

### Berufsausbildung und Studium

Sept. 1975 Aug. 1977	Berufsausbildung im Molkereifach, Milchhof Erfurt Abschluss: Molkereifachfrau
Sept. 1977-Aug. 1979	Facharbeiterin im Milchhof Erfurt
Sept. 1979	Humboldt Universität Berlin Studium der Fachrichtung Lebensmitteltechnologie Schwerpunkt Milchwissenschaft
Feb. 1984	Abschluss: Diplomingenieur

### Beruf

<b>März 1984-Sept. 1989</b> 1984-1985	<b><i>Volkseigener Betrieb (VEB) Schmelzkäsewerk Bad Berka</i></b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Transportbeauftragte und Assistentin des Abteilungsleiters für Produktion, Beschaffung und Absatz</li></ul>
Dez. 1985-Sept. 1989	<ul style="list-style-type: none"><li>• Abteilungsleiterin für Produktion, Beschaffung und Absatz</li></ul>
<b>Nov. 1989-Feb. 1995</b> 1991	<b><i>WIESBY GmbH &amp; Co. KG, Niebüll</i></b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Laborantin in der Abteilung Schimmelpilzkulturen</li><li>• Beschäftigt als Diplomingenieurin mit selbständiger Projektbearbeitung, Entwicklung und Optimierung von Züchtungsverfahren für Schimmelpilz- und Sonderkulturen</li></ul>
1993-1995	<ul style="list-style-type: none"><li>• Gruppenleiterin der Abtl. Schimmelpilzkulturen</li></ul>

---

Feb. 1995-Sept. 2006

***Landwirtschaftskammer Rheinland  
Milchwirtschaftliche Lehr- und Untersuchungsanstalt  
Krefeld***

Referentin mit Lehrauftrag im Fachbereich (FB) Mikrobiologie

- Sachverständige für sensorische Prüfungen
- Lehrauftrag für Mikrobiologische Praktika, Lebensmittelrecht, Qualitätsmanagement in den Ausbildungsberufen Milchwirtschaftlicher Laborant, Molkereifachmann und Molkereimeister
- Ausbildungsberaterin für den Beruf Molkereifachmann / frau
- Prüfungsausschussmitglied
- Stellv. Fachbereichsleiterin im FB Mikrobiologie
- Qualitätsmanagementbeauftragte für die Untersuchungsanstalt
- FB-Leiterin Mikrobiologie im Untersuchungsbereich

Feb. 1995-Dez. 2000  
seit Juli 1996

seit Jan. 2001

seit Sept. 2006

***Landwirtschaftskammer NRW  
Pflanzenschutzdienst Bonn***

Fachbereichsleiterin Diagnoselabor  
(Nematologie und Entomologie)

Krefeld, 04.09.2009